

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
26. April 2001 (26.04.2001)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 01/29227 A1

(51) Internationale Patentklassifikation: C12N 15/53,
9/02, A01H 5/00, C12N 5/10, A01K 67/00

Marburg (DE). FEUSSNER, Ivo [DE/DE]; Schleiermachers-
strasse 9, 06114 Halle (DE).

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP00/09912

(74) Gemeinsamer Vertreter: BASF AKTIENGE-
SELLSCHAFT; 67056 Ludwigshafen (DE).

(22) Internationales Anmeldedatum:
10. Oktober 2000 (10.10.2000)

(81) Bestimmungsstaaten (national): AU, CA, CN, JP, NO,
US.

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(84) Bestimmungsstaaten (regional): europäisches Patent (AT,
BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC,
NL, PT, SE).

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:
199 50 921.2 21. Oktober 1999 (21.10.1999) DE

Veröffentlicht:

— Mit internationalem Recherchenbericht.

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme
von US): BASF AKTIENGESELLSCHAFT [DE/DE];
67056 Ludwigshafen (DE).

— Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche geltenden
Frist; Veröffentlichung wird wiederholt, falls Änderungen
eintreffen.

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): KINDL, Helmut
[DE/DE]; Blane Hofstatt 8, 35043 Marburg (DE). MAY,
Christian [DE/DE]; Alter Kirchhainer Weg 36, 35039

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes, und der anderen
Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on
Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe
der PCT-Gazette verwiesen.

0050/50815
020322

(54) Title: THE BETA-BARREL OF THE LIPID BODY LIPOXYGENASE

(54) Bezeichnung: DAS BETA-BARREL DER LIPIDKÖRPERLIPOXYGENASE

(57) Abstract: The invention relates to an isolated nucleic acid sequence which codes for a polypeptide and consists of a combination of the nucleic acid sequences of a biosynthesis nucleic acid sequence of the fatty acid or lipid metabolism and the following nucleic acids: a) a nucleic acid sequence having the sequence as represented in SEQ ID NO: 1, b) nucleic acid sequences which derive from the degenerated genetic code of the nucleic acid sequence as represented in SEQ ID NO: 1, c) derivatives of the nucleic acid sequence as represented in SEQ ID NO: 1, said derivatives coding for polypeptides with the amino acid sequence as represented in SEQ ID NO: 2 and being provided with at least 60 % homology in the amino acid level, d) a nucleic acid sequence with the sequence as represented in SEQ ID NO: 3 or the aminoterminal component of the coding area pertaining to said sequence.

(57) Zusammenfassung: Die Erfindung betrifft eine isolierte Nukleinsäuresequenz, die für ein Polypeptid codiert und die aus einer Kombination der Nukleinsäuresequenzen einer Biosynthesenukleinsäuresequenz des Fettsäure- oder Lipidstoffwechsels mit einer der folgenden Nukleinsäuren zusammengesetzt wird: a) einer Nukleinsäuresequenz mit der in SEQ ID NO: 1 dargestellten Sequenz, b) Nukleinsäuresequenzen, die sich als Ergebnis des degenerierten genetischen Codes von der in SEQ ID NO: 1 dargestellten Nukleinsäuresequenz ableiten, c) Derivate der in SEQ ID NO: 1 dargestellten Nukleinsäuresequenz, die für Polypeptide mit der in SEQ ID NO: 2 dargestellten Aminosäuresequenzen codieren und mindestens 60 % Homologie auf Aminosäureebene aufweisen, d) einer Nukleinsäuresequenz mit der in SEQ ID NO: 3 dargestellten Sequenz oder des Aminoterminals Teils des kodierenden Bereichs dieser Sequenz.

WO 01/29227 A1

UP



DAS BETA-BARREL DER LIPIDKÖRPERLIPOXYGENASE

Beschreibung

5

Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zum Targeting von an der Biosynthese von Lipiden oder Fettsäuren beteiligten Proteinen in Liposomen oder Lipidkörpern. Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung von Fettsäuren und Lipiden in einem 10 Öl produzierenden Organismus.

Außerdem betrifft die Erfindung Nukleinsäuresequenzen, die für ein Polypeptid codieren und die aus einer Kombination von Nukleinsäuresequenzen einer Biosynthesenukleinsäuresequenzen des 15 Fettsäure- oder Lipidstoffwechsels mit einer Nukleinsäuresequenz, die für das Targeting von Proteinen codiert, zusammengesetzt ist. Weiterhin betrifft die Erfindung Nukleinsäurekonstrukte enthaltend diese Nukleinsäuresequenzen, Vektoren und transgene Organismen, die die Nukleinsäuren, Nukleinsäurekonstrukte 20 und/oder Vektoren enthalten.

Ölfrüchte spielen eine wichtige Rolle in der menschlichen Ernährung. In keimenden Samen werden die endogenen Speicher Triacylglycerid-speichernder Pflanzen abgebaut, damit sogar in 25 Abwesenheit von Licht die *de novo*-Bildung von neuem Gewebe möglich ist [Rees et al., Biochim. Biophys. Acta, 385, 1975: 145-156; Kindl, H., Biochimie, 75, 1993: 225-230]. Triacylglyceride werden in besonders hoch spezialisierten Geweben, z.B. im Endosperm oder den Kotyledonen, gespeichert. Zellen dieses 30 Typs enthalten Lipidkörper als Kompartimente, die das Fett speichern [Murphy, D. J., Prog. Lipid Res., 32, 1993:247-280; Huang, A. H. C., Curr. Opinion Struct. Biol., 4, 1994: 493-498]. Zu Beginn der Keimung werden die Lipidkörper und ihr Inhalt abgebaut und stellen Fettsäuren für die Glyoxysomen bereit, die 35 für die β -Oxidation der Fettsäuren verantwortlich sind [Kindl, H., Z. Naturforsch., C 52, 1997: 1-8]. In Gurken-Kotyledonen werden Phospholipase A₂ (PLA) [May, C. et al., Biochim. Biophys. Acta, 1393, 1998: 267-276] und eine bestimmte Isoform der Lipoxxygenase [Lipidkörperlipoxxygenase, LBLOX) [Feussner, I. et al., 40 Planta, 198, 1998: 288-293; Höhne, M. et al., Eur. J. Biochem., 241, 1996: 6-11.] beim Schritt der Triacylglycerid-Mobilisierung synthetisiert und zu den Lipidkörpern transportiert. PLA (ein Patatin-ähnliches Protein [May, C. et al., Biochim. Biophys. Acta, 1393, 1998: 267-276]) spielt eine entscheidende Rolle bei 45 der Einleitung des Mobilisierungsprozesses, indem es die Phospholipid-Monolayer der Lipidkörper zerstört [Noll, F. et al., J. Struct. Biol., 1999: eingereicht]. Anschließend bewirkt die

2

Lipoxygenase die Modifizierung der Acylreste in den Triacylglyceriden, bei denen es sich hauptsächlich um Linoleylgruppen handelt [Feussner, I. et al., FEBS Lett., 431, 1998: 433-436]. Schließlich wird nach Reduktion und der Einwirkung einer
5 spezifischen von Hydroxyoctadecadienoylresten abhängigen Lipase S-13-Hydroxyoctadecadienoat aus den Lipidkörpern ins Cytosol freigesetzt [Feussner, I. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 92, 1995: 11849-11853] und dann durch die Glyoxysomen abgebaut [Kindl, H., Biochimie, 75, 1993: 225-230; Kindl, H., Z. Natur-
10forsch., C 52, 1997: 1-8].

Im Verlauf der Lipidmobilisierung wird ein Satz neu synthetisierter Proteine an die Oberfläche der Lipidkörper transportiert [Sturm, A. et al., Eur. J. Biochem., 150, 1985: 461-468], darun-
15ter LBLOX und PLA. Frühere Arbeiten [May, C. et al., Biochim. Biophys. Acta, 1393, 1998: 267-276; Feussner, I. et al., Planta, 198, 1998: 288-293] haben gezeigt, dass LBLOX und PLA nur während eines kurzen Zeitraums, d. h. zu Beginn der Lipidmobilisierung, transient synthetisiert werden. Die Vorgänge beim Transport
20dieser Proteine innerhalb der pflanzlichen Zelle sind noch völlig unklar.

Es bestand daher die Aufgabe die Signale des intrazellulären Transport zu verstehen und für das Targeting von Proteinen zu nutzen.

25

Diese Aufgabe wurde durch ein Verfahren zum Targeting von an der Biosynthese von Lipiden oder Fettsäuren beteiligten Proteinen in Liposomen oder Lipidkörpern, dadurch gekennzeichnet, daß man die für die Proteine kodierenden Nukleinsäuren mit einer der
30folgenden Sequenzen in einer gemeinsamen Protein kodierenden Sequenz kombiniert:

a) einer Nukleinsäuresequenz mit der in SEQ ID NO: 1 dargestellten Sequenz,

35

b) Nukleinsäuresequenzen, die sich als Ergebnis des degenerierten genetischen Codes von der in SEQ ID NO: 1 dargestellten Nukleinsäuresequenz ableiten,

40 c) Derivate der in SEQ ID NO: 1 dargestellten Nukleinsäuresequenz, die für Polypeptide mit der in SEQ ID NO: 2 dargestellten Aminosäuresequenzen codieren und mindestens 60 % Homologie auf Aminosäureebene aufweisen,

45

3

d) einer Nukleinsäuresequenz mit der in SEQ ID NO:3 dargestellten Sequenz oder des Aminoterminalen Teils des kodierenden Bereichs dieser Sequenz, und

5 und die erhaltene Sequenz in einen eukaryontischen Organismus einbringt, gelöst.

In der vorliegenden Arbeit wurden Belege für einen post-translationalen Transfer von LBLOX und PLA zu Lipidkörpern gefunden.

10 Dabei zeigte sich, daß eine N-terminale Domäne der Lipidkörper-LOX, die als β -Barrel gefaltet ist, für die Membranbindungseigenschaften des Enzyms verantwortlich ist. Diese Domäne des Proteins codiert durch die erfindungsgemäße Nukleinsäuresequenz, das eine Membrantargeting-Struktur aufweist, kann im erfindungsgemäßen

15 Verfahren für das Proteintargeting von Fremdproteinen zu Lipidkörpern beispielsweise in Ölsamen verwendet werden.

Durch das erfindungsgemäße Verfahren ist es möglich Proteine, die vorteilhaft am Fettsäure- und/oder Lipidstoffwechsel beteiligt

20 sind gezielt an den Ort der gewünschten Synthese zu dirigieren.

Durch das Einbringen der Nukleinsäuresequenz in einen eukaryontischen Organismus können im erfindungsgemäßen Verfahren Proteine dirigiert werden. Dazu werden die Organismen in einem geeigneten

25 Medium angezogen.

Weitere Erfindungsgegenstände sind ein Verfahren zum Targeting von an der Biosynthese von Lipiden oder Fettsäuren beteiligten Proteinen in Liposomen oder Lipidkörpern, dadurch gekennzeichnet,

30 daß man mindestens eine wie unten beschriebene erfindungsgemäße Nukleinsäuresequenz oder mindestens ein Nukleinsäurekonstrukt in einen Öl produzierenden Organismus bringt.

Ein Verfahren zur Herstellung von Fettsäuren oder Lipiden dadurch gekennzeichnet, daß man mindestens eine erfindungsgemäße Nukleinsäuresequenz oder mindestens ein Nukleinsäurekonstrukt in einen Öl produzierenden Organismus bringt, diesen Organismus anzieht und daß in dem Organismus enthaltene Öl isoliert.

40 Ein Verfahren zur Herstellung von Fettsäuren dadurch gekennzeichnet, daß man mindestens eine erfindungsgemäße Nukleinsäuresequenz oder mindestens ein Nukleinsäurekonstrukt in einen Öl produzierenden Organismus bringt, diesen Organismus anzieht und daß in dem Organismus enthaltene Öl isoliert und die Fettsäuren
45 freisetzt.

Verfahren wie vorgehend beschrieben, dadurch gekennzeichnet, daß es sich bei dem Organismus um eine Pflanze oder einen eukaryontischen Mikroorganismus handelt.

- 5 Unter der oben beschriebenen Anzucht des Organismus ist die Kultivierung von Pflanzen ebenso zu verstehen wie die Anzucht von eukaryontischen Mikroorganismen wie Hefen, Pilze, Ciliaten, Algen, tierische oder pflanzliche Zellen oder Zellverbänden.
- 10 Als Organismen für das Verfahren seien beispielhaft Pflanzen wie Arabidopsis, Gerste, Weizen, Roggen, Hafer, Mais, Soja, Reis, Baumwolle, Zuckerrübe, Tee, Karotte, Paprika, Canola, Sonnenblume, Flachs, Hanf, Kartoffel, Triticale, Tabak, Tomate, Raps, Kaffee, Tapioka, Maniok, Pfeilwurz, Tagetes, Alfalfa, Erdnuß,
- 15 Rizinus, Kokosnuß, Ölpalme, Färbersaflor (*Carthamus tinctorius*), Salat und den verschiedenen Baum-, Nuß- und Weinspezies, oder Kakaobohne, Mikroorganismen wie Hefen wie *Yarrowia* oder *Saccharomyces*; Pilze *Mortierella*, *Saprolegnia*, *Traustochytrium* oder *Pythium*, Algen oder Protozoen wie Dinoflagellaten wie *Crypthe-*
- 20 *codinium* genannt. Bevorzugt werden Organismen, die natürlicherweise Öle in größeren Mengen synthetisieren können wie Mikroorganismen wie Hefen wie *Yarrowia lypolytica* oder *Saccharomyces cereviseae*, Pilze wie *Mortierella alpina*, *Pythium insidiosum* oder Pflanzen wie *Arabidopsis thaliana*, Soja, Raps (*Brassica napus*),
- 25 Kokosnuß, Ölpalme, Canola, Färbersaflor (*Carthamus tinctorius*), Rizinus, Calendula, Lein (*Linum usitatissimum*), Borretsch, Erdnuß, Kakaobohne oder Sonnenblume, besonders bevorzugt werden Soja, Raps oder Sonnenblume.
- 30 Die in den im erfindungsgemäßen Verfahren gewonnenen Organismen enthalten vorteilhaft gesättigte oder ungesättigte Fettsäuren in Form von gebundenen Fettsäuren, das heißt die ungesättigten Fettsäuren liegen überwiegend in Form ihrer Mono-, Di- oder Triglyceride, Glycolipide, Lipoproteine oder Phospholipide wie
- 35 Öle oder Lipide oder sonstig als Ester oder Amide gebundenen Fettsäuren vor. Auch freie Fettsäuren sind in den Organismen in Form der freien Fettsäuren oder in Form ihrer Salze enthalten. Die durch Anzucht im erfindungsgemäßen Verfahren gewonnenen Organismen und die in ihnen enthaltenen gesättigten oder unge-
- 40 sättigten Fettsäuren können direkt beispielsweise zur Herstellung von pharmazeutischen Zubereitungen, von Agrochemikalien, Futtermitteln oder Lebensmitteln verwendet werden oder aber nach Isolierung aus den Organismen. Dabei können alle Stufen der Aufreinigung der gesättigten oder ungesättigten Fettsäuren verwendet
- 45 werden, das heißt von Rohextrakten der Fettsäuren bis zu vollständig gereinigten Fettsäuren sind für die Herstellung der vorgenannten Produkte geeignet. In einer vorteilhaften Ausführungs-

5

form können die gebundenen Fettsäuren aus beispielsweise den Ölen bzw. Lipiden beispielsweise über eine basische Hydrolyse z.B. mit NaOH oder KOH freigesetzt werden. Diese freien Fettsäuren können direkt im erhaltenen Gemisch oder nach weiterer Aufreinigung zur Herstellung von pharmazeutischen Zubereitungen, von Agrochemikalien, Futtermitteln oder Lebensmitteln verwendet werden. Auch können die gebundenen oder freien Fettsäuren zur Umesterung oder Veresterung beispielsweise mit anderen Mono-, Di- oder Triglyceriden oder Glycerin verwendet werden, um den Anteil an ungesättigten Fettsäuren in diesen Verbindungen beispielsweise in den Triglyceriden zu erhöhen.

Die in den Verfahren verwendeten Organismen werden je nach Wirtsorganismus in dem Fachmann bekannter Weise angezogen bzw. gezüchtet. Mikroorganismen wie Bakterien, Pilze, Ciliaten, pflanzliche oder tierische Zellen werden in der Regel in einem flüssigen Medium, das eine Kohlenstoffquelle meist in Form von Zuckern, eine Stickstoffquelle meist in Form von organischen Stickstoffquellen wie Hefeextrakt oder Salzen wie Ammoniumsulfat, Spurenelemente wie Eisen-, Mangan-, Magnesiumsalze und gegebenenfalls Vitamine enthält, bei Temperaturen zwischen 0°C und 100°C, bevorzugt zwischen 10°C bis 60°C unter je nach Organismus Sauerstoffbegasung oder in Abwesenheit von Sauerstoff angezogen. Dabei kann der pH der Nährflüssigkeit auf einen festen Wert gehalten werden, das heißt der pH wird während der Anzucht reguliert oder der pH wird nicht reguliert und verändert sich während der Anzucht. Die Anzucht kann batch weise, semi batch weise oder kontinuierlich erfolgen. Nährstoffe können zu Beginn der Fermentation vorgelegt oder semikontinuierlich oder kontinuierlich nach gefüttert werden. Auch eine Anzucht auf festen Medien ist möglich.

Pflanzen werden nach Transformation in der Regel zunächst regeneriert und anschließend wie üblich angezüchtet bzw. angebaut. Dies kann im Gewächshaus oder im Freiland erfolgen.

Aus den Organismen werden nach Anzucht die Lipide in üblicher Weise gewonnen. Hierzu können die Organismen nach Ernte zunächst aufgeschlossen werden oder direkt verwendet werden. Die Lipide werden vorteilhaft mit geeigneten Lösungsmitteln wie apolare Lösungsmittel wie Hexan oder Ethanol, Isopropanol oder Gemischen wie Hexan/Isopropanol, Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol bei Temperaturen zwischen 0°C bis 80°C, bevorzugt zwischen 20°C bis 50°C extrahiert. Die Biomasse wird in der Regel mit einem Überschuß an Lösungsmittel extrahiert beispielsweise einem Überschuß von Lösungsmittel zu Biomasse von 1:4. Das Lösungsmittel wird anschließend beispielsweise über eine Destillation entfernt.

6

Die Extraktion kann auch mit superkritischem CO₂ erfolgen. Nach Extraktion kann die restliche Biomasse beispielsweise über Filtration entfernt werden.

- 5 Das so gewonnene Rohöl kann anschließend weiter aufgereinigt werden, beispielsweise in dem Trübungen über das Versetzen mit polaren Lösungsmittel wie Aceton oder Chloroform und anschließender Filtration oder Zentrifugation entfernt werden. Auch eine weitere Reinigung über chromatographische Verfahren, 10 Destillation oder Kristallisation ist möglich.

Zur Gewinnung der freien Fettsäuren aus den Triglyceriden werden diese in üblicherweise, wie oben beschrieben, verseift.

- 15 Ein weiterer Erfindungsgegenstand sind isolierte Nukleinsäuresequenzen, die für ein Polypeptid codiert und die aus einer Kombination der Nukleinsäuresequenzen einer Biosynthesenukleinsäuresequenz des Fettsäure- oder Lipidstoffwechsels mit einer der folgenden Nukleinsäuren zusammengesetzt wird:

20

- a) einer Nukleinsäuresequenz mit der in SEQ ID NO: 1 dargestellten Sequenz,
- b) Nukleinsäuresequenzen, die sich als Ergebnis des degenerierten genetischen Codes von der in SEQ ID NO: 1 dargestellten Nukleinsäuresequenz ableiten, 25
- c) Derivate der in SEQ ID NO: 1 dargestellten Nukleinsäuresequenz, die für Polypeptide mit der in SEQ ID NO: 2 dargestellten Aminosäuresequenzen codieren und mindestens 60 % 30 Homologie auf Aminosäureebene aufweisen,
- d) einer Nukleinsäuresequenz mit der in SEQ ID NO: 3 dargestellten Sequenz oder des Aminoterminalen Teils des 35 kodierenden Bereichs dieser Sequenz.

Diese erfindungsgemäßen Nukleinsäuresequenzen ermöglichen im erfindungsgemäßen Verfahren das Targeting von Proteinen.

- 40 Unter Derivate(n) sind beispielsweise funktionelle Homologe der von SEQ ID NO: 1 kodierten Proteine oder deren biologischer Aktivität, das heißt Proteine, die dieselben biologischen Reaktionen wie die von SEQ ID NO: 1 gesteuerten, zu verstehen. Diese Gene ermöglichen ebenfalls ein vorteilhaftes Targeting von 45 Proteinen. Unter biologischer Aktivität ist das Dirigieren von Proteinen vorteilhaft von Proteinen, die am Fettsäure- und/oder

Lipidstoffwechsel beteiligt sind, innerhalb der Zelle zu verstehen.

Die im erfindungsgemäßen Verfahren verwendeten Nukleinsäuresequenz(en) (für die Anmeldung soll der singular den plural umfassen und umgekehrt) oder Fragmente davon können vorteilhaft zur Isolierung weiterer genomischer Sequenzen über Homologiescreening verwendet werden.

- 10 Die genannten Derivate lassen sich beispielsweise aus anderen eukaryontischen Organismen wie Pilzen, Hefen oder Pflanzen wie speziell Moosen isolieren.

- Weiterhin sind unter Derivaten bzw. funktionellen Derivaten der in SEQ ID NO: 1 genannten Sequenz beispielsweise Allelvarianten zu verstehen, die mindestens 60 % Homologie auf der abgeleiteten Aminosäureebene, vorteilhaft mindestens 70 % Homologie, bevorzugt mindestens 80 % Homologie, besonders bevorzugt mindestens 85 % Homologie, ganz besonders bevorzugt 90 % Homologie aufweisen.
- 20 Die Homologie wurde über den gesamten Aminosäurebereich berechnet. Es wurde das Programm PileUp, BESTFIT, GAP, TRANSLATE bzw. BACKTRANSLATE (= Bestandteil des Programmpaketes UWGCG, Wisconsin Package, Version 10.0-UNIX, January 1999, Genetics Computer Group, Inc., Deverux et al., Nucleic. Acid Res., 12, 1984: 387-395) verwendet (J. Mol. Evolution., 25, 351-360, 1987, Higgins et al., CABIOS, 5 1989: 151-153). Die von den genannten Nukleinsäuren abgeleitete Aminosäuresequenz ist Sequenz SEQ ID NO: 2 zu entnehmen. Unter Homologie ist Identität zu verstehen, das heißt die Aminosäuresequenzen sind zu mindestens 60 %
- 30 identisch. Die erfindungsgemäßen Sequenzen sind auf Nukleinsäureebene mindestens 50 % Homolog, bevorzugt mindestens 60 %, besonders bevorzugt 70 %, ganz besonders bevorzugt mindestens 80 %.

- Allelvarianten umfassen insbesondere funktionelle Varianten, die durch Deletion, Insertion oder Substitution von Nukleotiden aus der in SEQ ID NO: 1 dargestellten Sequenz erhältlich sind, wobei die biologische Aktivität der abgeleiteten synthetisierten Proteine erhalten bleibt, das heißt diese Proteine besitzen noch immer die Fähigkeit des Proteintrajectings.

- 40 Solche DNA-Sequenzen lassen sich ausgehend von der in SEQ ID NO: 1 beschriebenen DNA-Sequenz oder Teilen dieser Sequenzen, beispielsweise mit üblichen Hybridisierungsverfahren oder der PCR-Technik aus anderen Eukaryonten wie beispielsweise
- 45 den oben genannt isolieren. Diese DNA-Sequenzen hybridisieren unter Standardbedingungen mit den genannten Sequenzen. Zur Hybridisierung werden vorteilhaft kurze Oligonukleotide vorteil-

haft von 20 bis 50 Nukleotiden Länge verwendet. Es können aber auch längere Fragmente der erfindungsgemäßen Nukleinsäuren oder die vollständigen Sequenzen für die Hybridisierung verwendet werden. Je nach der verwendeten Nukleinsäure: Oligonukleotid, 5 längeres Fragment oder vollständige Sequenz oder je nachdem welche Nukleinsäureart DNA oder RNA für die Hybridisierung verwendet werden, variieren diese Standardbedingungen. So liegen beispielsweise die Schmelztemperaturen für DNA:DNA-Hybride ca. 10°C niedriger als die von DNA:RNA-Hybriden gleicher Länge.

10

Unter Standardbedingungen sind beispielsweise je nach Nukleinsäure Temperaturen zwischen 42 und 58°C in einer wässrigen Pufferlösung mit einer Konzentration zwischen 0,1 bis 5 x SSC (1 x SSC = 0,15 M NaCl, 15 mM Natriumcitrat, pH 7,2) oder zusätzlich in 15 Gegenwart von 50 % Formamid wie beispielsweise 42°C in 5 x SSC, 50 % Formamid zu verstehen. Vorteilhafterweise liegen die Hybridisierungsbedingungen für DNA:DNA-Hybride bei 0,1 x SSC und Temperaturen zwischen etwa 20°C bis 45°C, bevorzugt zwischen etwa 30°C bis 45°C. Für DNA:RNA-Hybride liegen die Hybridisierungs- 20 bedingungen vorteilhaft bei 0,1 x SSC und Temperaturen zwischen etwa 30°C bis 55°C, bevorzugt zwischen etwa 45°C bis 55°C. Diese angegebenen Temperaturen für die Hybridisierung sind beispielhaft kalkulierte Schmelztemperaturwerte für eine Nukleinsäure mit einer Länge von ca. 100 Nukleotiden und einem G + C-Gehalt von 25 50 % in Abwesenheit von Formamid. Die experimentellen Bedingungen für die DNA-Hybridisierung sind in einschlägigen Lehrbüchern der Genetik wie beispielsweise Sambrook et al., "Molecular Cloning", Cold Spring Harbor Laboratory, 1989, beschrieben und lassen sich nach dem Fachmann bekannten Formeln beispielsweise abhängig von 30 der Länge der Nukleinsäuren, der Art der Hybride oder dem G + C-Gehalt berechnen. Weitere Informationen zur Hybridisierung kann der Fachmann folgenden Lehrbüchern entnehmen: Ausubel et al. (eds), 1985, Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, New York; Hames and Higgins (eds), 1985, Nucleic Acids 35 Hybridization: A Practical Approach, IRL Press at Oxford University Press, Oxford; Brown (ed), 1991, Essential Molecular Biology: A Practical Approach, IRL Press at Oxford University Press, Oxford.

40 Weiterhin sind unter Derivaten Homologe der Sequenz SEQ ID No: 1 beispielsweise eukaryontische Homologe, verkürzte Sequenzen, Einzelstrang-DNA der codierenden und nichtcodierenden DNA-Sequenz oder RNA der codierenden und nichtcodierenden DNA-Sequenz zu verstehen.

45

Außerdem sind unter Homologen der Sequenz SEQ ID NO: 1 Derivate wie beispielsweise Promotorvarianten zu verstehen. Diese Varianten können durch ein oder mehrere Nukleotidaustausche, durch Insertion(en) und/oder Deletion(en) verändert sein, ohne
5 daß aber die Funktionalität bzw. Wirksamkeit der Promotoren beeinträchtigt sind. Des weiteren können die Promotoren durch Veränderung ihrer Sequenz in ihrer Wirksamkeit erhöht oder komplett durch wirksamere Promotoren auch artfremder Organismen ausgetauscht werden.

10

Unter Derivaten sind auch vorteilhaft Varianten zu verstehen, deren Nukleotidsequenz im Bereich -1 bis -2000 vor dem Startkodon so verändert wurden, daß die Genexpression und/oder die Proteinexpression verändert, bevorzugt erhöht wird. Weiterhin sind unter
15 Derivaten auch Varianten zu verstehen, die am 3'-Ende verändert wurden.

Die Nukleinsäuresequenzen, die für die erfindungsgemäßen Proteine kodieren, können synthetisch hergestellt oder natürlich gewonnen
20 sein oder eine Mischung aus synthetischen und natürlichen DNA-Bestandteilen enthalten, sowie aus verschiedenen heterologen Genabschnitten verschiedener Organismen bestehen. Im allgemeinen werden synthetische Nukleotid-Sequenzen mit Codons erzeugt, die von den entsprechenden Wirtsorganismen beispielsweise Pflanzen
25 bevorzugt werden. Dies führt in der Regel zu einer optimalen Expression der heterologen Gene. Diese von Pflanzen bevorzugten Codons können aus Codons mit der höchsten Proteinhäufigkeit bestimmt werden, die in den meisten interessanten Pflanzenspezies exprimiert werden. Ein Beispiel für *Corynebacterium glutamicum*
30 ist gegeben in: Wada et al. (1992) *Nucleic Acids Res.* 20:2111-2118). Die Durchführung solcher Experimente sind mit Hilfe von Standardmethoden durchführbar und sind dem Fachmann auf dem Gebiet bekannt.

35 Funktionell äquivalente Sequenzen, die für die erfindungsgemäßen Proteine kodieren, sind solche Derivate der erfindungsgemäßen Sequenz, welche trotz abweichender Nukleotidsequenz noch die gewünschten Funktionen, das heißt die biologische Aktivität der Proteine besitzen. Funktionelle Äquivalente umfassen somit natür-
40 lich vorkommende Varianten der hierin beschriebenen Sequenzen sowie künstliche, z.B. durch chemische Synthese erhaltene, an den Codon-Gebrauch einer Pflanze angepaßte, künstliche Nukleotid-Sequenzen.

45 Außerdem sind artifizielle DNA-Sequenzen geeignet, solange sie, wie oben beschrieben, die gewünschte Eigenschaft beispielsweise das Targeting im Fettsäure- und/oder Lipidstoffwechsel ver-

mitteln. Solche artifiziellen DNA-Sequenzen können beispielsweise durch Rückübersetzung mittels Molecular Modelling konstruierter Proteine, die die biologische Aktivität aufweisen, oder durch in vitro-Selektion ermittelt werden. Mögliche Techniken zur in vitro-Evolution von DNA zur Veränderung bzw. Verbesserung der DNA-Sequenzen sind beschrieben bei Patten, P.A. et al., Current Opinion in Biotechnology 8, 724-733 (1997) oder bei Moore, J.C. et al., Journal of Molecular Biology 272, 336-347 (1997). Besonders geeignet sind codierende DNA-Sequenzen, die durch Rückübersetzung einer Polypeptidsequenz gemäß der für die Wirtspflanze spezifischen Codon-Nutzung erhalten werden.

Als Bestandteile der erfindungsgemäßen Nukleinsäuren seien Biosynthesegene des Fettsäure- und/oder des Lipidstoffwechsels genannt wie vorteilhaft eine Sequenz die für Proteine aus der folgenden Gruppe von Proteinen codiert:

Acyl-CoA-Dehydrogenase(n), Acyl-ACP[= acyl carrier protein]-Desaturase(n), Acyl-ACP-Thioesterase(n), Fettsäure-Acyl-Transferase(n), Fettsäure-Synthase(n), Fettsäure-Hydroxylase(n), Acetyl-Coenzym A-Carboxylase(n), Acyl-Coenzym A-Oxidase(n), Fettsäure-Desaturase(n), Fettsäure-Acetylenasen, Lipoxygenasen, Triacylglycerol-Lipasen, Allenoxid-Synthasen, Hydroperoxid-Lyasen und/oder Fettsäure-Elongase(n). Vorteilhaft handelt es sich dabei um Nukleinsäuren, die für eines der folgenden Proteine codieren: Fettsäure-Acyl-Transferase(n), $\Delta 4$ -Desaturase, $\Delta 5$ -Desaturase, $\Delta 6$ -Desaturase, $\Delta 9$ -Desaturase, $\Delta 12$ -Desaturase, $\Delta 15$ -Desaturase und/oder eine Fettsäure-Elongase

Die genannten Nukleinsäure-Sequenzen codieren für sogenannte Fusionsproteine kodieren, wobei Bestandteil des Fusionsproteins ein Polypeptid mit der in SEQ ID NO: 2 genannten Sequenz oder ein funktionell äquivalenter Teil davon ist. Der zweite Teil des Fusionsproteins kann z.B. ein weiteres Polypeptid mit enzymatischer Aktivität wie beispielsweise die oben genannten Proteine sein.

Vorteilhaft können die Nukleinsäuren im erfindungsgemäßen Verfahren mit weiteren Genen der Fettsäurebiosynthese kombiniert werden. Beispiele für derartige Gene sind die Acetyltransferasen, weitere Desaturasen oder Elongasen ungesättigter oder gesättigter Fettsäuren wie in WO 00/12720 beschrieben. Für die in-vivo und speziell in-vitro Synthese ist die Kombination mit z.B. NADH-Cytochrom B5 Reduktasen vorteilhaft, die Reduktionsäquivalente aufnehmen oder abgeben können.

11

Unter den im erfindungsgemäßen Verfahren verwendeten Proteine sind Proteine zu verstehen, die eine in der Sequenz SEQ ID NO: 2 dargestellte Aminosäuresequenz oder eine daraus durch Substitution, Inversion, Insertion oder Deletion von einem oder
5 mehreren Aminosäureresten erhältliche Sequenz enthalten, wobei die biologische Aktivität des in SEQ ID NO: 2 dargestellten Proteins erhalten bleibt bzw. nicht wesentlich reduziert wird. Unter nicht wesentlich reduziert sind alle Proteine zu verstehen, die noch mindestens 10 %, bevorzugt 20 %, besonders bevorzugt
10 30 % der biologischen Aktivität des Ausgangsproteins aufweisen. Dabei können beispielsweise bestimmte Aminosäuren durch solche mit ähnlichen physikochemischen Eigenschaften (Raumerfüllung, Basizität, Hydrophobizität etc.) ersetzt werden. Beispielsweise werden Argininreste gegen Lysinreste, Valinreste gegen Isoleucin-
15 reste oder Asparaginsäurereste gegen Glutaminsäurereste ausgetauscht. Es können aber auch ein oder mehrere Aminosäuren in ihrer Reihenfolge vertauscht, hinzugefügt oder entfernt werden, oder es können mehrere dieser Maßnahmen miteinander kombiniert werden.

20

Unter Derivaten sind auch funktionelle Äquivalente zu verstehen, die insbesondere auch natürliche oder künstliche Mutationen einer ursprünglich isolierten für die erfindungsgemäßen Proteine codierende Sequenz beinhalten, welche weiterhin die gewünschte
25 Funktion zeigen, das heißt das deren biologische Aktivität nicht wesentlich reduziert ist. Mutationen umfassen Substitutionen, Additionen, Deletionen, Vertauschungen oder Insertionen eines oder mehrerer Nukleotidreste. Somit werden beispielsweise auch solche Nukleotidsequenzen durch die vorliegende Erfindung mit
30 umfaßt, welche man durch Modifikation der für das Protein codierenden Nukleotidsequenz erhält. Ziel einer solchen Modifikation kann z.B. die weitere Eingrenzung der darin enthaltenen codierenden Sequenz oder z.B. auch die Einfügung weiterer Restriktionsenzym-Schnittstellen sein.

35

Funktionelle Äquivalente sind auch solche Varianten, deren Funktion, verglichen mit dem Ausgangsgen bzw. Genfragment, abgeschwächt (= nicht wesentlich reduziert) oder verstärkt ist (= biologische Aktivität ist stärker als die Aktivität des Aus-
40 gangsprotein, das heißt Aktivität ist höher als 100 %, bevorzugt höher als 110 %, besonders bevorzugt höher als 130 %).

Die im erfindungsgemäßen Verfahren verwendeten oben genannten Nukleinsäuresequenzen werden vorteilhaft zum Einbringen in einen
45 Wirtsorganismus in eine Expressionskassette (= Nukleinsäurekonstrukt) inseriert. Die Nukleinsäuresequenzen können jedoch auch direkt in den Wirtsorganismus eingebracht werden. Die Nuklein-

säuresequenz kann dabei vorteilhaft beispielsweise eine DNA- oder cDNA-Sequenz sein. Zur Insertion in eine Expressionskassette geeignet codierende Sequenzen sind beispielsweise solche, die das erfindungsgemäße Proteintargeting ermöglichen. Diese Sequenzen
5 können homologen oder heterologen Ursprungs sein.

Unter einer Expressionskassette (= Nukleinsäurekonstrukt oder -fragment) ist die in SEQ ID NO: 1 genannte Sequenz, die sich als Ergebnis des genetischen Codes und/oder deren funktionellen oder
10 nicht funktionellen Derivate zu verstehen, die mit einem oder mehreren Regulationssignalen vorteilhafterweise zur Erhöhung der Genexpression funktionell verknüpft wurden und welche die Expression der codierenden Sequenz in der Wirtszelle steuern. Diese regulatorischen Sequenzen sollen die gezielte Expression
15 der Gene und der Proteinexpression ermöglichen. Dies kann beispielsweise je nach Wirtsorganismus bedeuten, daß das Gen erst nach Induktion exprimiert und/oder überexprimiert wird, oder daß es sofort exprimiert und/oder überexprimiert wird. Beispielsweise handelt es sich bei diesen regulatorischen Sequenzen um Sequenzen
20 an die Induktoren oder Repressoren binden und so die Expression der Nukleinsäure regulieren. Zusätzlich zu diesen neuen Regulationssequenzen oder anstelle dieser Sequenzen kann die natürliche Regulation dieser Sequenzen vor den eigentlichen Strukturgenen noch vorhanden sein und gegebenenfalls genetisch verändert worden
25 sein, so daß die natürliche Regulation ausgeschaltet und die Expression der Gene erhöht wurde. Das Genkonstrukt kann aber auch einfacher aufgebaut sein, das heißt es wurden keine zusätzlichen Regulationssignale vor die Nukleinsäuresequenz oder dessen Derivate inseriert und der natürliche Promotor mit seiner Regulation wurde nicht entfernt. Stattdessen wurde die natürliche
30 Regulationssequenz so mutiert, daß keine Regulation mehr erfolgt und/oder die Genexpression gesteigert wird. Diese veränderten Promotoren können in Form von Teilsequenzen (= Promotor mit Teilen der erfindungsgemäßen Nukleinsäuresequenzen) auch allein
35 vor das natürliche Gen zur Steigerung der Aktivität gebracht werden. Das Genkonstrukt kann außerdem vorteilhafterweise auch eine oder mehrere sogenannte "enhancer Sequenzen" funktionell verknüpft mit dem Promotor enthalten, die eine erhöhte Expression der Nukleinsäuresequenz ermöglichen. Auch am 3'-Ende der DNA-
40 Sequenzen können zusätzliche vorteilhafte Sequenzen inseriert werden wie weitere regulatorische Elemente oder Terminatoren. Die erfindungsgemäßen Nukleinsäuresequenzen können in einer oder mehreren Kopien in der Expressionskassette (= Genkonstrukt) enthalten sein. Auch eventuell mit exprimierten weiteren Genen, die
45 vorteilhaft an der Fettsäurebiosynthese beteiligt sind, können in

13

einer oder mehreren Kopien in der Expressionskassette vorhanden sein.

Die regulatorischen Sequenzen bzw. Faktoren können dabei wie
5 oben beschrieben vorzugsweise die Genexpression der eingeführten Gene positiv beeinflussen und dadurch erhöhen. So kann eine Verstärkung der regulatorischen Elemente vorteilhafterweise auf der Transkriptionsebene erfolgen, indem starke Transkriptionssignale wie Promotoren und/oder "Enhancer" verwendet werden. Daneben ist
10 aber auch eine Verstärkung der Translation möglich, indem beispielsweise die Stabilität der mRNA verbessert wird.

Als Promotoren im Nukleinsäurekonstrukt sind grundsätzlich alle Promotoren geeignet, die die Expression von Fremdgenen in
15 Organismen vorteilhaft in Pflanzen oder Pilzen steuern können. Vorzugsweise verwendet man insbesondere einen pflanzlichen Promotor oder Promotoren, die beispielsweise aus einem Pflanzenvirus entstammen. Vorteilhafte Regulationssequenzen für das erfindungsgemäße Verfahren sind beispielsweise in Promotoren wie
20 cos-, tac-, trp-, tet-, trp-tet-, lpp-, lac-, lpp-lac-, lacI^q-, T7-, T5-, T3-, gal-, trc-, ara-, SP6-, λ -P_R- oder im λ -P_L-Promotor enthalten, die vorteilhafterweise in gram-negativen Bakterien Anwendung finden. Weitere vorteilhafte Regulationssequenzen sind beispielsweise in den gram-positiven Promotoren amy und SPO2, in
25 den Hefe- oder Pilzpromotoren ADC1, MF α , AC, P-60, CYC1, GAPDH, TEF, rp28, ADH oder in den Pflanzenpromotoren wie CaMV/35S [Franck et al., Cell 21(1980) 285-294], SSU, OCS, lib4, STLS1, B33, nos (= Nopalin Synthase Promotor) oder im Ubiquitin-Promotor enthalten. Die Expressionskassette kann auch einen chemisch
30 induzierbaren Promotor enthalten, durch den die Expression des exogenen Gens in den Organismen vorteilhaft in den Pflanzen zu einem bestimmten Zeitpunkt gesteuert werden kann. Derartige vorteilhafte Pflanzenpromotoren sind beispielsweise der PRP1-Promotor [Ward et al., Plant.Mol. Biol.22(1993), 361-366], ein
35 durch Benzensulfonamid-induzierbarer (EP 388186), ein durch Tetrazyklin-induzierbarer (Gatz et al., (1992) Plant J. 2,397-404), ein durch Salizylsäure induzierbarer Promotor (WO 95/19443), ein durch Abscisinsäure-induzierbarer (EP335528) bzw. ein durch Ethanol- oder Cyclohexanon-induzierbarer
40 (WO93/21334) Promotor. Weitere Pflanzenpromotoren sind beispielsweise der Promotor der cytosolischen FBPase aus Kartoffel, der ST-LSI Promotor aus Kartoffel (Stockhaus et al., EMBO J. 8 (1989) 2445-245), der Promotor der Phosphoribosylpyrophosphat Amido-transferase aus Glycine max (siehe auch Genbank Accession Nummer
45 U87999) oder ein Nodien-spezifischen Promotor wie in EP 249676 können vorteilhaft verwandt werden. Vorteilhaft sind insbesondere solche pflanzlichen Promotoren, die die Expression in Geweben

oder Pflanzenteilen/-organen sicherstellen, in denen die Fettsäurebiosynthese bzw. dessen Vorstufen stattfindet wie beispielsweise im Endosperm oder im sich entwickelnden Embryo. Insbesondere zu nennen sind vorteilhafte Promotoren, die eine samenspezifische Expression gewährleisten wie beispielsweise der USP-Promotor oder Derivate davon, der LEB4-Promotor, der Phaseolin-Promotor oder der Napin-Promotor. Der erfindungsgemäß aufgeführte und besonders vorteilhafte USP-Promotor oder dessen Derivate vermitteln in der Samenentwicklung eine sehr früh Genexpression (Baeumlein et al., Mol Gen Genet, 1991, 225 (3): 459-67). Weitere vorteilhafte samenspezifische Promotoren, die für monokotyle und dikotyle Pflanzen verwendet werden können, sind die für Dikotyle geeignete Promotoren wie ebenfalls beispielhaft angeführte Napingen-Promotor aus Raps (US5,608,152), der Oleosin-Promotor aus Arabidopsis (WO98/45461), der Phaseolin-Promotor aus Phaseolus vulgaris (US5,504,200), der Bce4-Promotor aus Brassica (WO91/13980) oder der Leguminosen B4-Promotor (LeB4, Baeumlein et al., Plant J., 2, 2, 1992: 233 - 239) oder für Monokotyle geeignete Promotoren wie die Promotoren des lpt2- oder lpt1-Gens aus Gerste (WO95/15389 und WO95/23230) oder die Promotoren des Gersten Hordein-Gens, des Reis Glutelin-Gens, des Reis Oryzin-Gens, des Reis Prolamin-Gens, des Weizen Gliadin-Gens, des Weizen Glutelin-Gens, des Mais Zein-Gens, des Hafer Glutelin-Gens, des Sorghum Kasirin-Gens oder des Roggen Secalin-Gens, die in WO99/16890 beschrieben werden.

Weiterhin sind insbesondere solche Promotoren bevorzugt, die die Expression in Geweben oder Pflanzenteilen sicherstellen, in denen beispielsweise die Biosynthese von Fettsäuren, Ölen und Lipiden bzw. deren Vorstufen stattfindet. Insbesondere zu nennen sind Promotoren, die eine samenspezifische Expression gewährleisten. Zu nennen sind der Promotor des Napin-Gens aus Raps (US 5,608,152), des USP-Promotor aus Vicia faba (USP=unbekanntes Samenprotein, Baeumlein et al., Mol Gen Genet, 1991, 225 (3): 459-67), des Oleosin-Gens aus Arabidopsis (WO98/45461), des Phaseolin-Promotors (US 5,504,200) oder der Promotor des Legumin B4-Gens (LeB4; Baeumlein et al., 1992, Plant Journal, 2 (2): 233-9). Weiterhin sind zu nennen Promotoren, wie der des lpt2 oder lpt1-Gens aus Gerste (WO95/15389 und WO95/23230), die in monokotylen Pflanzen samenspezifische Expression vermitteln.

In der Expressionskassette (= Genkonstrukt, Nukleinsäurekonstrukt) können wie oben beschrieben noch weitere Gene, die in die Organismen eingebracht werden sollen, enthalten sein. Diese Gene können unter getrennter Regulation oder unter der gleichen Regulationsregion wie die erfindungsgemäßen Nukleinsäuren liegen. Bei diesen Genen handelt es sich beispielsweise um weitere Bio-

15

synthesegene vorteilhaft der Fettsäurebiosynthese, die eine gesteigerte Synthese ermöglichen. Beispielsweise seien die Gene für die $\Delta 15$ -, $\Delta 12$ -, $\Delta 9$ -, $\Delta 6$ -, $\Delta 5$ -, $\Delta 4$ -Desaturase, die verschiedenen Hydroxylasen, die Acyl-ACP-Thioesterasen, β -Ketoacyl-Synthasen
5 oder β -Ketoacyl-Reductasen genannt. Vorteilhaft werden die Desaturasegene im Nukleinsäurekonstrukt verwendet.

Prinzipiell können alle natürlichen Promotoren mit ihren Regulationssequenzen wie die oben genannten für die erfindungs-
10 gemäße Expressionskassette und das erfindungsgemäße Verfahren, wie oben beschrieben, verwendet werden. Darüberhinaus können auch synthetische Promotoren vorteilhaft verwendet werden.

Es können verschiedene DNA-Fragmente manipuliert werden, um eine
15 Nukleotid-Sequenz zu erhalten, die zweckmäßigerweise in der korrekten Richtung gelesen wird und die mit einem korrekten Leseraster ausgestattet ist. Für die Verbindung der DNA-Fragmente (= erfindungsgemäße Nukleinsäuren) miteinander können an die Fragmente Adaptoren oder Linker angesetzt werden.

20 Zweckmäßigerweise können die Promotor- und die Terminator-Regionen in Transkriptionsrichtung mit einem Linker oder Polylinker, der eine oder mehrere Restriktionsstellen für die Insertion dieser Sequenz enthält, versehen werden. In der Regel
25 hat der Linker 1 bis 10, meistens 1 bis 8, vorzugsweise 2 bis 6 Restriktionsstellen. Im allgemeinen hat der Linker innerhalb der regulatorischen Bereiche eine Größe von weniger als 100 bp, häufig weniger als 60 bp, mindestens jedoch 5 bp. Der Promotor kann sowohl nativ bzw. homolog als auch fremdartig bzw. hetero-
30 log zum Wirtsorganismus beispielsweise zur Wirtspflanze sein. Die Expressionskassette beinhaltet in der 5'-3'-Transkriptionsrichtung den Promotor, eine DNA-Sequenz, die für ein im erfindungsgemäßen Verfahren verwendetes Gen codiert und eine Region für die transkriptionale Termination. Verschiedene
35 Terminationsbereiche sind gegeneinander beliebig austauschbar.

Ferner können Manipulationen, die passende Restriktionsschnittstellen bereitstellen oder die überflüssige DNA oder Restriktionsschnittstellen entfernen, eingesetzt werden. Wo Insertionen,
40 Deletionen oder Substitutionen wie z.B. Transitionen und Transversionen in Frage kommen, können *in vitro*-Mutagenese, -primer-repair-, Restriktion oder Ligation verwendet werden. Bei geeigneten Manipulationen, wie z.B. Restriktion, -chewing-back- oder Auffüllen von Überhängen für -bluntends-, können komplementäre
45 Enden der Fragmente für die Ligation zur Verfügung gestellt werden.

16

Von Bedeutung für eine vorteilhafte hohe Expression kann u.ä. das Anhängen des spezifischen ER-Retentionssignals SEKDEL sein (Schouten, A. et al., Plant Mol. Biol. 30 (1996), 781-792), die durchschnittliche Expressionshöhe wird damit verdreifacht bis 5 vervierfacht. Es können auch andere Retentionssignale, die natürlicherweise bei im ER lokalisierten pflanzlichen und tierischen Proteinen vorkommen, für den Aufbau der Kassette eingesetzt werden.

- 10 Bevorzugte Polyadenylierungssignale sind pflanzliche Polyadenylierungssignale, vorzugsweise solche, die im wesentlichen T-DNA-Polyadenylierungssignale aus *Agrobacterium tumefaciens*, insbesondere des Gens 3 der T-DNA (Octopin Synthase) des Ti-Plasmids pTiACH5 entsprechen (Gielen et al., EMBO J.3 (1984), 15 835 ff) oder entsprechende funktionelle Äquivalente.

Die Herstellung eines Nukleinsäurekonstruktes erfolgt durch Fusion eines geeigneten Promotors mit einer geeigneten erfindungsgemäßen Nukleinsäuresequenz sowie einem Poly-
20 adenylierungssignal nach gängigen Rekombinations- und Klonierungstechniken, wie sie beispielsweise in T. Maniatis, E.F. Fritsch und J. Sambrook, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY (1989) sowie in T.J. Silhavy, M.L. Berman und L.W. Enquist,
25 Experiments with Gene Fusions, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY (1984) und in Ausubel, F.M. et al., Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing Assoc. and Wiley-Interscience (1987) beschrieben werden.

- 30 Die DNA Sequenz codierend für eine Lipidkörperlipoxygenase aus Gurke beinhaltet alle Sequenzmerkmale, die notwendig sind, um eine dem Ort der Fettsäure-, Lipid- oder Ölbiosynthese korrekte Lokalisation zu erreichen. Daher sind keine weiteren Targetingsequenzen per se notwendig. Allerdings kann eine solche Lokali-
35 sation wünschenswert und vorteilhaft sein und daher künstlich verändert oder verstärkt werden, so daß auch solche Fusionskonstrukte eine bevorzugte vorteilhafte Ausführungsform der Erfindung sind.

- 40 Insbesondere bevorzugt sind Sequenzen, die ein Targeting in Plastiden gewährleisten. Unter bestimmten Umständen kann auch ein Targeting in andere Kompartimente (referiert: Kermode, Crit. Rev. Plant Sci. 15, 4 (1996), 285-423) z.B. in die Vakuole, in das Mitochondrium, in das Endoplasmatische Retikulum (ER),
45 Peroxisomen, Lipidkörper oder durch ein Fehlen entsprechender

operativer Sequenzen ein Verbleib im Kompartiment des Entstehens, dem Zytosol, wünschenswert sein.

Vorteilhafterweise werden die für erfindungsgemäßen Proteine 5 kodierenden Nukleinsäuresequenzen zusammen mit mindestens einem Reportergen in eine Expressionskassette kloniert, die in den Organismus über einen Vektor oder direkt in das Genom eingebracht wird. Dieses Reportergen sollte eine leichte Detektierbarkeit über einen Wachstums-, Fluoreszenz-, Chemo-, Biolumineszenz- oder 10 Resistenzassay oder über eine photometrische Messung ermöglichen. Beispielfähig seien als Reportergene Antibiotika- oder Herbizid-resistenzgene, Hydrolasogene, Fluoreszenzproteingene, Bio-lumineszenzgene wie das Ura3-Gen, das Ilv2-Gen, das 2-Desoxyglucose-6-synthasegene, Zucker- oder Nukleotidstoffwechselgene oder Bio-phosphat-Phosphatasen, das β -Glucuronidase-Gen, β -Lactamasen, 15 das β -Galactosidasen, das gfp-Gen, das Hygromycinphospho-transferasegen oder das BASTA (= Gluphosinatresistenz)-Gen genannt. Diese Gene ermöglichen eine leichte Meßbarkeit und 20 Quantifizierbarkeit der Transkriptionsaktivität und damit der Expression der Gene. Damit lassen sich Genomstellen identifizieren, die eine unterschiedliche Produktivität zeigen.

Gemäß einer bevorzugten Ausführungsform umfaßt eine Expressions- 25 kassette stromaufwärts, d.h. am 5'-Ende der codierenden Sequenz, einen Promotor und gegebenenfalls weitere regulatorische adenylierungssignale und stromabwärts, d.h. am 3'-Ende, ein Poly-Elemente, welche mit der dazwischenliegenden codierenden Sequenz DNA sequenz operativ verknüpft sind. Unter einer operativen Ver- 30 knüpfung versteht man die sequenzielle Anordnung von Promotor, codierender Sequenz, Terminator und ggf. weiterer regulatorischer Elemente derart, daß jedes der codierenden Elemente seine Funktion bei der Expression der codierenden Sequenz bestimmungsgemäß erfüllen kann. Die zur operativen Verknüpfung bevorzugten 35 Sequenzen sind Targeting-Sequenzen zur Gewährleistung der subzellulären Lokalisation.

Eine Expressionskassette kann beispielsweise einen konstitutiven Promotor (bevorzugt den USP- oder Napin-Promotor) und das zu 40 exprimierende Gen enthalten.

Die Expressionskassette wird zur Expression in einem prokaryontischen oder eukaryontischen Wirtsorganismus beispielsweise einem Mikroorganismus wie einem Pilz oder einer Pflanze vorteilhafterweise in einen Vektor wie beispielsweise einem Plasmid, einem 45 Phagen oder sonstiger DNA inseriert, der eine optimale Expression der Gene im Wirtsorganismus ermöglicht. Geeignete Plasmide sind

- beispielsweise in *E. coli* pLG338, pACYC184, pBR-Serie wie z.B. pBR322, pUC-Serie wie pUC18 oder pUC19, M13mp-Serie, pKC30, pRep4, pHS1, pHS2, pPLc236, pMBL24, pLG200, pUR290, pIN-III¹¹³-B1, λ gt11 oder pBdCI, in *Streptomyces* pIJ101, pIJ364, pIJ702 oder
5 pIJ361, in *Bacillus* pUB110, pC194 oder pBD214, in *Corynebacterium* pSA77 oder pAJ667, in Pilzen pALS1, pIL2 oder pBB116, weitere vorteilhafte Pilzvektoren werden von Romanos, M.A. et al., [(1992) "Foreign gene expression in yeast: a review", *Yeast* 8: 423-488] und von van den Hondel, C.A.M.J.J. et al. [(1991)
10 "Heterologous gene expression in filamentous fungi] sowie in More Gene Manipulations in Fungi [J.W. Bennet & L.L. Lasure, eds., p. 396-428: Academic Press: San Diego] und in "Gene transfer systems and vector development for filamentous fungi" [van den Hondel, C.A.M.J.J. & Punt, P.J. (1991) in: Applied Molecular
15 Genetics of Fungi, Peberdy, J.F. et al., eds., p. 1-28, Cambridge University Press: Cambridge] beschrieben. Vorteilhafte Hefevektoren sind beispielsweise 2 μ M, pAG-1, YEpl3 oder pEM-BLYe23. Beispiele für Algen- oder Pflanzenvektoren sind pLGV23, pGHIac⁺, pBIN19, pAK2004, pVKH oder pDH51 (siehe Schmidt, R. and
20 Willmitzer, L., 1988). Die oben genannten Vektoren oder Derivate der vorstehend genannten Vektoren stellen eine kleine Auswahl der möglichen Plasmide dar. Weitere Plasmide sind dem Fachmann wohl bekannt und können beispielsweise aus dem Buch Cloning Vectors (Eds. Pouwels P.H. et al. Elsevier, Amsterdam-New York-Oxford,
25 1985, ISBN 0 444 904018) entnommen werden. Geeignete pflanzliche Vektoren werden unter anderem in "Methods in Plant Molecular Biology and Biotechnology" (CRC Press), Kap. 6/7, S.71-119 beschrieben. Vorteilhafte Vektoren sind sog. shuttle-Vektoren oder binäre Vektoren, die in *E. coli* und *Agrobacterium* replizieren.
30
Unter Vektoren sind außer Plasmiden auch alle anderen dem Fachmann bekannten Vektoren wie beispielsweise Phagen, Viren wie SV40, CMV, Baculovirus, Adenovirus, Transposons, IS-Elemente, Phasmide, Phagemide, Cosmide, lineare oder zirkuläre DNA zu
35 verstehen. Diese Vektoren können autonom im Wirtsorganismus repliziert oder chromosomal repliziert werden, bevorzugt ist eine chromosomale Replikation.
- In einer weiteren Ausgestaltungsform des Vektors kann die
40 erfindungsgemäße Expressionskassette auch vorteilhafterweise in Form einer linearen DNA in die Organismen eingeführt werden und über heterologe oder homologe Rekombination in das Genom des Wirtsorganismus integriert werden. Diese lineare DNA kann aus einem linearisierten Plasmid oder nur aus der Expressionskassette
45 als Vektor oder den erfindungsgemäßen Nukleinsäuresequenzen bestehen.

19

In einer weiteren vorteilhaften Ausführungsform kann die erfindungsgemäße Nukleinsäuresequenz auch alleine in einen Organismus eingebracht werden.

- 5 Sollen neben der erfindungsgemäßen Nukleinsäuresequenz weitere Gene in den Organismus eingeführt werden, so können alle zusammen mit einem Reportergen in einem einzigen Vektor oder jedes einzelne Gen mit einem Reportergen in je einem Vektor oder mehrere Gene zusammen in verschiedenen Vektoren in den Organismus ein-
10 gebracht werden, wobei die verschiedenen Vektoren gleichzeitig oder sukzessive eingebracht werden können.

Der Vektor enthält vorteilhaft mindestens eine Kopie der erfindungsgemäßen Nukleinsäuresequenzen und/oder der Expressions-
15 kassette.

Beispielhaft kann die pflanzliche Expressionskassette in den Transformationsvektor pRT ((a) Toepfer et al., 1993, Methods Enzymol., 217: 66-78; (b) Toepfer et al. 1987, Nucl. Acids. Res.
20 15: 5890 ff.) eingebaut werden.

Alternativ kann ein rekombinanter Vektor (= Expressionsvektor) auch in-vitro transkribiert und translatiert werden, z.B. durch Nutzung des T7 Promotors und der T7 RNA Polymerase.

25

In Prokaryoten verwendete Expressionsvektoren nutzen häufig induzierbare Systeme mit und ohne Fusionsproteinen bzw Fusions-oligopeptiden, wobei diese Fusionen sowohl N-terminal als auch C-terminal oder anderen nutzbaren Domänen eines Proteins erfolgen
30 können. Solche Fusionsvektoren dienen in der Regel dazu: i.) die Expressionsrate der RNA zu erhöhen ii.) die erzielbare Proteinsyntheserate zu erhöhen, iii.) die Löslichkeit des Proteins zu erhöhen, iv.) oder die Reinigung durch einen für die Affinitätschromatographie nutzbare Bindesequenz zu vereinfachen. Häufig
35 werden auch proteolytische Spaltstellen über Fusionsproteine eingeführt, was die Abspaltung eines Teils des Fusionsproteins auch der Reinigung ermöglicht. Solche Erkennungssequenzen für Proteasen erkennen sind z.B. Faktor Xa, Thrombin und Entero-kinase.

40

Typische vorteilhafte Fusions- und Expressionsvektoren sind pGEX [Pharmacia Biotech Inc; Smith, D.B. and Johnson, K.S. (1988) Gene 67: 31-40], pMAL (New England Biolabs, Beverly, MA) and pRIT5 (Pharmacia, Piscataway, NJ) welches Glutathion S-transferase
45 beinhaltet (GST), Maltose Bindeprotein, oder Protein A.

20

Weitere Beispiele für E. coli Expressionsvektoren sind pTrc [Amann et al., (1988) *Gene* 69:301-315] und pET Vektoren [Studier et al., *Gene Expression Technology: Methods in Enzymology* 185, Academic Press, San Diego, California (1990) 60-89; Stratagene, 5 Amsterdam, Niederlande].

Weitere vorteilhafte Vektoren zur Verwendung in Hefe sind pYep-Sec1 (Baldari, et al., (1987) *Embo J.* 6:229-234), pMFa (Kurjan and Herskowitz, (1982) *Cell* 30:933-943), pJRY88 (Schultz et al., 10 (1987) *Gene* 54:113-123), and pYES-Derivate (Invitrogen Corporation, San Diego, CA). Vektoren für die Nutzung in filamentösen Pilzen sind beschrieben in: van den Hondel, C.A.M.J.J. & Punt, P.J. (1991) "Gene transfer systems and vector development for filamentous fungi, in: *Applied Molecular Genetics of Fungi*, 15 J.F. Peberdy, et al., eds., p. 1-28, Cambridge University Press: Cambridge.

Alternativ können auch vorteilhaft Insektenzellexpressionsvektoren genutzt werden z.B. für die Expression in Sf 9 Zellen. 20 Dies sind z.B. die Vektoren der pAc Serie (Smith et al. (1983) *Mol. Cell Biol.* 3:2156-2165) und der pVL series (Lucklow and Summers (1989) *Virology* 170:31-39).

Des weiteren können zur Genexpression vorteilhaft Pflanzenzellen oder Algenzellen genutzt werden. Beispiele für Pflanzenexpressionsvektoren finden sich in Becker, D., et al. (1992) 25 "New plant binary vectors with selectable markers located proximal to the left border", *Plant Mol. Biol.* 20: 1195-1197 oder in Bevan, M.W. (1984) "Binary *Agrobacterium* vectors for 30 plant transformation", *Nucl. Acid. Res.* 12: 8711-8721.

Weiterhin können die erfindungsgemäßen Nukleinsäuresequenzen in Säugerzellen exprimiert werden. Beispiel für entsprechende Expressionsvektoren sind pCDM8 und pMT2PC genannt in: Seed, B. 35 (1987) *Nature* 329:840 oder Kaufman et al. (1987) *EMBO J.* 6: 187-195). Dabei sind vorzugsweise zu nutzende Promotoren viralen Ursprungs wie z.B. Promotoren des Polyoma, Adenovirus 2, Cyto-megalovirus oder Simian Virus 40. Weitere prokaryotische und eukaryotische Expressionssysteme sind genannt in Kapitel 16 und 40 17 in Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 2nd, ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989.

21

Das Einbringen der erfindungsgemäßen Nukleinsäuren, der Expressionskassette oder des Vektors in Organismen beispielsweise in Pflanzen kann prinzipiell nach allen dem Fachmann bekannten Methoden erfolgen.

5

Für Mikroorganismen kann der Fachmann entsprechende Methoden den Lehrbüchern von Sambrook, J. et al. (1989) Molecular cloning: A laboratory manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, von F.M. Ausubel et al. (1994) Current protocols in molecular biology, John Wiley and Sons, von D.M. Glover et al., DNA Cloning Vol.1, (1995), IRL Press (ISBN 019-963476-9), von Kaiser et al. (1994) Methods in Yeast Genetics, Cold Spring Harbor Laboratory Press oder Guthrie et al. Guide to Yeast Genetics and Molecular Biology, Methods in Enzymology, 1994, Academic Press entnehmen.

15

Die Übertragung von Fremdgenen in das Genom einer Pflanze wird als Transformation bezeichnet. Es werden dabei die beschriebenen Methoden zur Transformation und Regeneration von Pflanzen aus Pflanzengeweben oder Pflanzenzellen zur transienten oder stabilen Transformation genutzt. Geeignete Methoden sind die Protoplastentransformation durch Polyethylenglykol-induzierte DNA-Aufnahme, das biolistische Verfahren mit der Genkanone - die sogenannte particle bombardment Methode -, die Elektroporation, die Inkubation trockener Embryonen in DNA-haltiger Lösung, die Mikroinjektion und der durch Agrobacterium vermittelte Gentransfer. Die genannten Verfahren sind beispielsweise in B. Jenes et al., Techniques for Gene Transfer, in: Transgenic Plants, Vol. 1, Engineering and Utilization, herausgegeben von S.D. Kung und R. Wu, Academic Press (1993) 128-143 sowie in Potrykus Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Molec. Biol. 42 (1991) 205-225 beschrieben. Vorzugsweise wird das zu exprimierende Konstrukt in einen Vektor kloniert, der geeignet ist, Agrobacterium tumefaciens zu transformieren, beispielsweise pBin19 (Bevan et al., Nucl. Acids Res. 12 (1984) 8711). Mit einem solchen Vektor transformierte Agrobakterien können dann in bekannter Weise zur Transformation von Pflanzen, insbesondere von Kulturpflanzen, wie z.B. von Tabakpflanzen, verwendet werden, indem beispielsweise verwundete Blätter oder Blattstücke in einer Agrobakterienlösung gebadet und anschließend in geeigneten Medien kultiviert werden. Die Transformation von Pflanzen mit Agrobacterium tumefaciens wird beispielsweise von Höfgén und Willmitzer in Nucl. Acid Res. (1988) 16, 9877 beschrieben oder ist unter anderem bekannt aus F.F. White, Vectors for Gene Transfer in Higher Plants; in Transgenic Plants, Vol. 1, Engineering and Utilization, herausgegeben von S.D. Kung und R. Wu, Academic Press, 1993, S. 15-38.

22

Mit einem wie oben beschriebenen Expressionsvektor transformierte Agrobakterien können ebenfalls in bekannter Weise zur Transformation von Pflanzen wie Testpflanzen wie Arabidopsis oder Kulturpflanzen wie Getreide, Mais, Hafer, Roggen, Gerste, Weizen, 5 Soja, Reis, Baumwolle, Zuckerrübe, Canola, Triticale, Reis, Sonnenblume, Flachs, Hanf, Kartoffel, Tabak, Tomate, Kaffee, Kakao, Tee, Karotte, Paprika, Raps, Tapioka, Maniok, Pfeilwurz, Tagetes, Alfalfa, Salat und den verschiedenen Baum-, Nuß- und Weinspezies, insbesondere von Öl-haltigen Kulturpflanzen, wie 10 Soja, Erdnuß, Rizinus, Borretsch, Lein, Sonnenblume, Canola, Baumwolle, Flachs, Raps, Kokosnuß, Ölpalme, Färbersaflor (*Carthamus tinctorius*) oder Kakaobohne verwendet werden, z.B. indem verwundete Blätter oder Blattstücke in einer Agrobakterienlösung gebadet und anschließend in geeigneten Medien kultiviert 15 werden.

Die genetisch veränderten Pflanzenzellen können über alle dem Fachmann bekannten Methoden regeneriert werden. Entsprechende Methoden können den oben genannten Schriften von S.D. Kung und 20 R. Wu, Potrykus oder Höfgen und Willmitzer entnommen werden.

Als Organismen bzw. Wirtsorganismen für die erfindungsgemäßen Verfahren verwendeten Nukleinsäuren, das verwendete Nukleinsäurekonstrukt oder den verwendeten Vektor eignen sich prinzipiell 25 vorteilhaft alle Organismen, die in der Lage sind Fettsäuren speziell ungesättigte Fettsäuren zu synthetisieren bzw. für die Expression rekombinanter Gene geeignet sind. Beispielhaft seien Pflanzen wie Arabidopsis, Asteraceae wie Calendula oder Kulturpflanzen wie Brassica, Linium, Soja, Erdnuß, Rizinus, Sonnenblume, Mais, Baumwolle, Flachs, Raps, Kokosnuß, Ölpalme, Färbersaflor (*Carthamus tinctorius*) oder Kakaobohne, Mikroorganismen wie Hefen beispielsweise die Gattungen *Yarrowia* oder *Saccharomyces*, Pilze beispielsweise die Gattung *Mortierella*, *Saprolegnia* oder *Pythium*, Bakterien wie die Gattung *Escherichia*, Cyano- 30 bakterien, Ciliaten, Algen oder Protozoen wie Dinoflagellaten wie *Cryptothecodinium* genannt. Bevorzugt werden Organismen, die natürlicherweise Öle in größeren Mengen synthetisieren können wie Hefen wie *Saccharomyces cerevisiae* oder *Yarrowia lipolytica*, Pilze der Gattungen *Mortierella*, *Traustochytrium* oder *Pythium* wie 40 *Mortierella alpina*, *Pythium insidiosum* oder Pflanzen wie Brassica napus, Linium usitatissimum, Soja, Raps, Kokosnuß, Ölpalme, Färbersaflor, Rizinus, Calendula, Erdnuß, Kakaobohne oder Sonnenblume, besonders bevorzugt werden Soja, Raps, Sonnenblume, Rizinus, *Mortierella* oder *Pythium*. Prinzipiell sind als Wirts- 45 organismen auch transgene Tiere geeignet beispielsweise *C. elegans*.

23

Nutzbare Wirtszellen sind weiterhin genannt in: Goeddel, Gene Expression Technology: Methods in Enzymology 185, Academic Press, San Diego, CA (1990).

- 5 Verwendbare Expressionsstämme z.B. solche, die eine geringere Proteaseaktivität aufweisen sind beschrieben in: Gottesman, S., Gene Expression Technology: Methods in Enzymology 185, Academic Press, San Diego, California (1990) 119-128.
- 10 Dabei kann je nach Wahl des Promotors die Expression der erfindungsgemäßen Nukleinsäuresequenzen spezifisch in den Blättern, in den Samen, den Knollen oder anderen Teilen der Pflanze erfolgen. Solche Fettsäuren, Öle oder Lipide über-
- 15 produzierenden transgenen Pflanzen, deren Vermehrungsgut, sowie deren Pflanzenzellen, -gewebe oder -teile, sind ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung. Ein bevorzugter erfindungsgemäßer Gegenstand sind transgene Pflanzen beispielsweise Kulturpflanzen wie Mais, Hafer, Roggen, Weizen, Gerste, Mais, Reis, Soja, Zuckerrübe, Canola, Triticale, Sonnenblume,
- 20 Flachs, Hanf, Tabak, Tomate, Kaffee, Kakao, Tee, Karotte, Paprika, Raps, Tapioka, Maniok, Pfeilwurz, Tagetes, Alfalfa, Salat und den verschiedenen Baum-, Nuß- und Weinspezies, Kartoffel, insbesondere Öl-haltige Kulturpflanzen, wie Soja, Erdnuß, Rizinus, Borretsch, Lein, Sonnenblume, Canola, Baum-
- 25 wolle, Flachs, Raps, Kokosnuß, Ölpalme, Färbersaflor (Carthamus tinctorius) oder Kakaobohne, Testpflanzen wie Arabidopsis oder sonstige Pflanzen wie Moose oder Algen enthaltend eine erfindungsgemäße funktionelle Nukleinsäuresequenz oder eine funktionelle Expressionskassette. Funktionell bedeutet hierbei,
- 30 daß ein biologisch aktives Protein gebildet wird.

Die Expressionskassette oder die erfindungsgemäßen Nukleinsäuresequenzen enthaltend eine erfindungsgemäße Nukleinsäuresequenz kann darüber hinaus auch zur Transformation der oben beispielhaft

35 genannten Organismen wie Bakterien, Cyanobakterien, filamentösen Pilzen, Ciliaten, Tiere oder Algen mit dem Ziel einer Erhöhung des Gehaltes an Fettsäuren, Ölen oder Lipiden eingesetzt werden. Bevorzugte transgene Organismen sind Hefen, Pilze oder Pflanzen, besonders bevorzugt Pflanzen.

40

Unter transgenen Organismen sind Organismen zu verstehen, die eine Fremde aus einem anderen Organismus stammende Nukleinsäure, die für ein im erfindungsgemäßen Verfahren verwendetes Protein kodiert, enthalten. Unter transgenen Organismen sind auch

- 45 Organismen zu verstehen, die eine Nukleinsäure, die aus demselben Organismus stammt, enthält, wobei diese Nukleinsäure als zusätzliche Genkopie enthalten ist oder nicht in der natürlichen

24

Nukleinsäureumgebung der erfindungsgemäßen Nukleinsäuresequenz enthalten ist. Transgene Organismen sind auch Organismen bei denen die natürliche 3'- und/oder 5'-Region der erfindungsgemäßen Nukleinsäure durch gezielte gentechnologische Veränderungen
5 gegenüber dem Ausgangsorganismus verändert wurde. Bevorzugt sind transgene Organismen bei denen eine Fremd-DNA eingebracht wurde. Besonders bevorzugt sind transgene Pflanzen. Unter transgenen Pflanzen sind einzelne Pflanzenzellen und deren Kulturen wie beispielsweise Kalluskulturen auf Festmedien oder in Flüssig-
10 kultur, Pflanzenteile und ganze Pflanzen zu verstehen.

Beispiele:

Pflanzenmaterial und Zellfraktionierung

15

Gurkensamen wurden im Dunkeln bei 26°C 2 oder 4 Tage, wie für jede einzelne Präparation angegeben, keimen gelassen. Die Kotyledonen wurden geerntet und homogenisiert, indem sie wie zuvor beschrieben [Kindl, H. et al., Methods Enzymol., 96, 1983: 700-715] mit
20 einem Skalpell zerschnitten wurden. Nach der Entfernung von Zelltrümmern und differentieller Zentrifugation wurden die Sedimente der Zentrifugation bei 10 000 x g oder der Zentrifugation bei 100 000 x g in einem Saccharosegradienten gemäß [Sturm, A. et al., FEBS Lett., 160, 1983: 165-168] sedimentiert oder
25 flotiert. Eine rohe Lipidkörperfraktion wurde erhalten, indem der Überstand einer kurzen (10 min) Zentrifugation bei 2000 x g einer Zentrifugation für 30 min bei 10 000 x g unterworfen und die im oberen Abschnitt des Zentrifugenröhrchens gebildete Lipidschicht entnommen wurde. Die weitere Reinigung der Lipidkörper erfolgte
30 durch leichtes Suspendieren der Lipidschicht und wiederholtes Flotieren [Sturm, A. et al., Eur. J. Biochem., 150, 1985: 461-468].

Tabakpflanzen wurden bei 22°C unter Dauerbelichtung (2000 lux)
35 in Magenta-Kästen kultiviert. Die Medien zur Züchtung von Transformanten waren gemäß [Horsch, R. B. et al., Science 227, 1985: 1229-1231; Jefferson, R. A. et al., EMBO J., 6, 1987: 3901-3907].

Plasmidkonstruktionen und Präparation von Proteinen

40

Zur Herstellung von Deletionsformen der LBLOX wurde CSLBLOX-221 im Vektor pSport-1 [Höhne, M. et al., Eur. J. Biochem., 241, 1996: 6-11] verwendet. Eine N-terminale Deletion wurde hergestellt, indem CSLBLOX-221 zuerst mit *Sma*I/*Nde*I und anschließend
45 mit *Hae*III gespalten wurde. Nach der Ligation in pSport-1 (Life Technologies) wurde dieses Konstrukt, bei dem die ersten 80 Nukleotide von pCSLBLOX-221 deletiert waren [Höhne, M. et al.,

25

Eur. J. Biochem., 241, 1996: 6-11], als LBLOXA80N bezeichnet. Nach der Herstellung von mRNA mittels *in vitro*-Transkription begann die Translation des entsprechenden Proteins bei einem Methioninrest, der dem Nukleotid 192 von pCSLBLOX-221 entsprach, und dem Protein fehlten somit die 48 N-terminalen Aminosäurereste der Wildtyp-LBLOX. Sowohl LBLOXA51 als auch LBLOXA96 waren Deletionen im C-terminalen Bereich stromabwärts des Aminosäurerestes 696. LBLOXA51 und LBLOXA96 wiesen Deletionen von 51 oder 96 Aminosäureresten hinter der Position 696 auf, besaßen aber den ursprünglichen C-Terminus. Für diese Präparationen wurde die MscI-Stelle bei Nukleotid 2128 von p-CSLBLOX-221 zur Spaltung eingesetzt, und das stromaufwärts gelegene Fragment wurde an die entsprechenden C-terminalen Fragmente, die mittels PCR hergestellt wurden, ligiert. Zur Konstruktion von LBLOXA504 wurden die NdeI-Stelle von pCSLBLOX-221 bei Nukleotid 1450 und die AatII-Stelle stromabwärts des Translationsstops von pCSLBLOX-221 zur Deletion des gesamten C-terminalen Teils von LBLOX verwendet. Nach Herstellung glatter Enden und Religierung dieser Stellen fehlte dem entsprechenden Protein, das mittels *in vitro*-Transkription/Translation des Konstrukts hergestellt wurde, die C-terminale Hälfte des LBLOX-Moleküls.

Zur Klonierung eines Fusionsproteins, GST-LBLOX244, wurde als N-terminaler Teil ein Fragment, das aus der 26 kDa großen Glutathion-S-transferase-Domäne [Smith, D. B. et al., Gene, 67, 1988: 31-40] von *Schistosoma japonicum* stammte, und als C-terminaler Teil der N-terminale Abschnitt von LBLOX, der aus 244 Aminosäureresten besteht, verwendet. Unter Verwendung des BamHI/XhoI-gespaltenen Genfusionsvektors pGEX-4T-3 (Pharmacia) und eines 732 Nukleotide großen Fragmentes, das den Aminosäureresten 1-244 von LBLOX entsprach, für die Klonierung und als Affinitätsmarkierung für die Proteinreinigung wurde das Fusionsprotein GST-LBLOX244 mittels Chromatographie auf Glutathion-Sepharose 4B (Pharmacia) isoliert.

Die Expression von LBLOX in Bakterien wurde nach Klonieren des Inserts von pCSLBLOX-221 in einen pQE-Vektor (Quiagen) durchgeführt. Zur Herstellung von LBLOX mittels *in vitro*-Translation wurde die im Vektor pSport-1 enthaltene LBLOX-Sequenz, pCSLBLOX-221 [Höhne, M. et al., Eur. J. Biochem., 241, 1996: 6-11], mit AatII gespalten, unter Verwendung von T7-Polymerase transkribiert und in Retikulozytenlysate translatiert. Ebenso wurde das Patatin-ähnliche Protein (das mit Phospholipase A₂ identisch ist) mittels *in vitro*-Transkription/Translation unter Verwendung von pCSPAT-291 und der PLA-cDNA unter Kontrolle des

26

T7-Promotors erhalten [May. C. et al., Biochim. Biophys. Acta 1393, 1998: 267-276].

Transfektion von Tabak

5

Unter Verwendung des Vektors pBI121 (Clontech), der den 35S-RNA-Promotor des Blumenkohlmosaikvirus, die kodierende Region des β -Glucuronidase-Gens und den NOS-Terminator enthält, wurde das Konstrukt pBI121AGUS hergestellt, indem die GUS-Kassette mit *Sma*I und *Sst*I ausgeschnitten und unter Verwendung von T4-DNA-Polymerase ein glattes Ende hergestellt wurde. Im Vektor pSport-1 enthaltenes LBLOX [Höhne, M. et al., Eur. J. Biochem., 241, 1996: 6-11] wurde mit *Sma*I/*Bam*HI ausgeschnitten, mit einem *Bam*HI-Linker ligiert und in den *Bam*HI-gespaltenen dephosphorylierten Vektor pBI121AGUS eingebracht. Das Produkt, pBI121AGUS-LBLOX, wurde entweder für die Transformation in *Agrobacterium tumefaciens* verwendet oder weiter zu pBI121AGUS-LBLOX-HA₃ modifiziert. Die Konstruktion des letzteren Plasmids wurde durchgeführt, indem eine einzige *Sac*I-Stelle hinter dem Nukleotid 252 von pCSLBLOX-221 verwendet wurde. Nach der Spaltung mit *Sac*I und Dephosphorylierung wurde eine dreifache Hämagglutinin-Markierung (HA-Markierung), die mit einer *Sac*I-Stelle ausgestattet war, inseriert. Unter Berücksichtigung der 3 -YPYDVPDYA-Sequenzen und der Linker betrug die Gesamtlänge des Inserts 30 Aminosäuren.

25

Agrobacterium tumefaciens LB-A4404 wurde mit pBI121AGUS-LBLOX oder pBI121AGUS-LBLOX-HA₃ nach dem Gefrier-Auftau-Verfahren transformiert. Diese Bakterien wurden zur Transformation von Blattscheiben von *Nicotiana tabacum* cv. Petit Havanna SR-1 gemäß dem etablierten Verfahren von Horsch et al. [Science 227, 1985: 1229-1231] verwendet. Die Sprosse wurden auf Linsmaier-und-Skoog-Medium, das mit 0,5 mg/l N-Benzylaminopurin, 500 mg/l Cefotaxim und 75 mg/l Kanamycin angereichert war, selektiert. Kanamycin-resistente Pflanzen mit erhöhten LOX-Spiegeln wurden vegetativ vermehrt.

35

Präparation von HA-markiertem LBLOX durch Expression in Tabak

Blätter homozygoter Kanamycin-resistenter Tabaklinien, die das pBI121AGUS-LBLOX-HA₃-Konstrukt enthielten, wurden in 50 mM Hepes-NaOH, pH 7,4, 5 mM MgCl₂, 0,5 mM EDTA, 50 mM KCl, 2,5 mM Dithiothreitol, 2 mM Phenylmethylsulfonylfluorid und 15% (Gew./Gew.) Saccharose (Puffer A) in Anwesenheit von Polyvinylpyrrolidon (25 000) (Merck) homogenisiert. Nach den Zentrifugationen wurde der Überstand der 100 000 x g Zentrifugation entsalzt, eingeeengt und auf einer großen Biogel-A-1,5-Säule fraktioniert. Fraktionen, die dem 100 kDa-Bereich entsprachen

40

45

27

und mittels Western-Blots unter Verwendung von anti-HA-Antiserum analysiert worden waren, wurden gesammelt. Dieses mutierte LBLOX-Protein enthielt hinter dem Aminosäurerest 68 des Wildtyp-Enzyms eine Insertion von 30 Aminosäureresten, die einer dreifachen HA-Markierung entsprach, und hatte eine theoretische Molekülmasse von 104 kDa. Dieser Größenunterschied zwischen dem Wildtyp- und dem rekombinanten Protein wurde mittels SDS-PAGE eindeutig nachgewiesen.

10 Radioaktive Markierung von Proteinen mittels *in vitro*-Synthese

Die Translation wurde unter Verwendung von gereinigten mRNAs, Retikulozytenlysat und [³⁵S]L-Methionin in Anwesenheit oder Abwesenheit von Hundepankreas-Mikrosomen durchgeführt. Alternativ wurden aus Gurken-Kotyledonen präparierte Mikrosomen für co-translationale oder post-translationale Transportassays verwendet.

Markierung von Proteinen mittels *in vivo*-Proteinsynthese

20

Experimente zur radioaktiven Markierung *in vivo* wurden als kurze Puls-Experimente mit Kotyledonen von 4 Tage lang gekeimten Keimlingen durchgeführt. Fünf g Kotyledonen wurde in Stücke von 2 mm geschnitten und mit 8 MBq [³⁵S]L-Methionin (40 TBq/mmol) 15 min inkubiert. Die vorsichtige Homogenisierung und Herstellung von Subfraktionen wurde wie vorstehend beschrieben durchgeführt.

Verabreichung von ⁴⁵Ca²⁺ und Analyse der Lipidkörperfraktion

30 Zwei g Kotyledonen, die von 2,5 Tage (= T) im Dunkeln bei 26°C gewachsenen Gurkenkeimlingen gesammelt worden waren, wurden in Stücke geschnitten und im Dunkeln 3 Std. mit 6 MBq ⁴⁵Ca²⁺ (8 GBq/mmol) inkubiert. Nach der Homogenisierung durch Zerkleinern mit einem Skalpell in Anwesenheit von Puffer A wurde das Homogenat 25 min bei 2000 x g zentrifugiert. Nach dem Entfernen der obersten Schicht, die Lipidkörper enthielt, und Dekantieren vom Sediment wurde der Extrakt einer Zentrifugation für 1 Std. bei 100 000 x g unterworfen.

40 Die Fraktion, die die Lipidkörper enthielt, wurde in Puffer A resuspendiert, auf 30% (Gew./Gew.) Saccharose eingestellt und mit Puffer A überschichtet. Nach Zentrifugation bei 100 000 g für 1 Std. wurden die flotierten Lipidkörper gesammelt und verschiedenen Waschverfahren unterworfen.

45

Präparation von Liposomen

Liposomen wurden gemäß [Woodle, M C. & Papahadjopoulos, D., Methods Enzymol. 171, 1989: 193-217] aus einem rohen Sojabohnen-
5 lecithin-Gemisch (Sigma) oder aus definiertem Dilinoleoylphosphatidylcholin, mit oder ohne Zugabe des Serinderivates, als unilamellare Vesikel hergestellt. Routinemäßig betrug unter Verwendung von Detergenzsolubilisierung und -entfernung das Mol-
verhältnis von Dilinoleoylphosphatidylcholin zu Natriumcholat
10 0,6:1,0. Die Effizienz der Dergenzentfernung mittels Dialyse in der mit einer PM10-Membran ausgerüsteten Amicon-Kammer wurde kontrolliert [Yamazaki, N. et al., Methods Enzymol. 242, 1994: 56-65]. Die Größe der Vesikel wurde unter dem Mikroskop durch Vergleich mit der Größe ($10 \pm 0,5 \mu\text{m}$) von MonoQ-Perlen (Pharmacia)
15 bestimmt. Für bestimmte Experimente wurden Triacylglyceride (Trilinolein) in die Liposomen eingebaut, so dass Phospholipidbedeckte Lipidtröpfchen erhalten wurden, die mit "schwarzen" Lipidkörpern vergleichbar sind. Diese Präparation wurde eingeleitet, indem 200 mg Sojabohnenlecithin und 500 mg Trilinolein in
20 10 ml Methanol/Chloroform (1:1) gelöst wurden. Nach dem Entfernen des Lösungsmittels im Vakuum wurde der Rückstand in Dialysepuffer gemäß [Yamazaki, N. et al., Methods Enzymol. 242, 1994: 56-65] resuspendiert. In jedem Fall wurden die durch Flotation gewonnenen Vesikel mittels DSC analysiert. Der Durchmesser der
25 Liposomen war im Bereich von $1 \mu\text{m}$.

Bindungsexperimente in Kombination mit dem Flotierungsassay

Eine Liposomensuspension, die 1 mg Lecithin entsprach, in 150 mM
30 NaCl, 50 mM Tris-HCl, pH 8,0, wurde 10 min entweder mit $4 \mu\text{g}$ unmarkiertem Protein oder mit dem Überstand eines Retikulozytenlysat-Translationsgemischs inkubiert. Nach dem Einstellen auf 42 % (Gew./Gew.) Saccharose wurde die Suspension in ein 12-ml-Zentrifugenröhrchen überführt. Ein linearer Saccharose-Dichtegradient von 37-26% (Gew./Gew.) Saccharose wurde auf die Probe
35 geschichtet. Die Flotierung der Protein-bedeckten Liposomen erfolgte durch Zentrifugation für 6 Std bei 100 000 g. Nach der Fraktionierung erfolgte die Proteinanalyse mittels SDS-PAGE und Immunmarkierung.

40

Bindungsexperimente mit Lipidkörpern oder Mikrosomen wurden auf analoge Weise durchgeführt. Alle Dichten in den Saccharosegradienten sind in Korrelation mit der Saccharosekonzentration (Gew./Gew.) angegeben.

45

Immunologische Verfahren

Die Antiseren gegen LBLOX [Sturm, A. et al., Eur. J. Biochem. 150, 1985: 461-468], PLA [May, C. et al., Biochim. Biophys. Acta 1393, 1998: 267-276] und Isocitratlyase [Frevert, J. & Kindl, H. Eur. J. Biochem., 92, 1978: 35-43] wurden in Kaninchen hergestellt. Außerdem wurden monoklonale Antikörper gegen GST (Pharmacia) und das Epitop aus dem Hämagglutininprotein des menschlichen Influenzavirus (Boehringer) verwendet. Immunfällungen der radioaktiv markierten Enzyme wurden unter Standardbedingungen (Verfahren 1) durchgeführt, indem 1 µg des entsprechenden gereinigten Proteins vor der Fällung mit 20 µl Antiserum zum Gemisch gegeben wurde. Nach Stehenlassen für 12 Std. bei 20°C und 20 Std. bei 4°C wurde das Präzipitat durch Zentrifugation bei 3000 x g sedimentiert. Das Sediment wurde mindestens 5mal gewaschen und dann in SDS gelöst. Für die direkte Fällung anderer Proteine (Verfahren 2) wurde das Antigen nicht weiter verdünnt, sondern 6 Std. mit 2 µl Antiserum inkubiert und anschließend mit Protein-A-Sepharose gemischt. Nach dem Überführen des Gemischs in ein kleines Gefäß und ausgiebigem Waschen wurde das Antigen zusammen mit den IgG unter Verwendung von 100 mM Essigsäure eluiert.

Weitere Assays

Zum Vergleich der Proteinstrukturen wurde eine eingeschränkte Proteolyse im Gel durchgeführt [Höhne, M. et al., Eur. J. Biochem. 241, 1996: 6-11]. Die DSC-Analyse des Lipids erfolgte auf Silica-Gel G (Merck) unter Verwendung von Methanol-Chloroform-Wasser, 65:25:4, als Lösungsmittelsystem.

30

ERGEBNIISE

Zur Untersuchung der Abfolge von Schritten, die für den Transfer von LBLOX vom Ribosom zu seinem endgültigen zellulären Bestimmungsort erforderlich sind, wurden zunächst untersucht, welche Pools in der Zelle das LBLOX-Protein durchquert. Zweitens wurden die für den Transfer verantwortliche Targeting-Struktur, -sequenz oder -domänen lokalisiert.

Untersuchungen mit LBLOX in vivo und in vitro zur Unterscheidung zwischen co-translationalem Transport in das ER und post-translationalem Transport zu Lipidkörpern

Es wurden keine Unterschiede zwischen der Molekülmasse von in vitro-translatiertem LBLOX und den am ER oder an Lipidkörpern membrangebundenen zellulären Formen beobachtet (Fig. 1A). Dies zeigt, dass der Transport zu den Membranen ohne sichtbar

30

chemische Modifikationen erfolgt. Sowohl ein co-translati-
onaler Transport zum ER und der anschließende Transfer in die Lipid-
körper als auch ein post-translati-
onaler Transport zu den Lipid-
körpern über einen cytosolischen Pool waren wahrscheinliche
5 Mechanismen, mit denen LBLOX seine endgültige Stelle in der
Zelle erreichen kann. Zuerst wurde eine *in vitro*-Translation
von LBLOX-mRNA unter co-translati-
onalen Transportbedingungen in
Anwesenheit von Mikrosomen aus Hundepankreas oder Mikrosomen aus
Gurkenkotyledonen durchgeführt. Als zweites wurde ein ähnliches
10 Protokoll verwendet, um zu testen, ob radioaktiv markiertes
LBLOX-Translatat auch zu den Membranen transportiert wurde,
wenn die Translation und die Zugabe von Mikrosomen nacheinander
erfolgten (Fig. 1B). Im letzteren Fall wurden die Ribosomen
vor der Zugabe von Mikrosomen mittels Zentrifugation vom neu
15 synthetisierten Protein entfernt. Nach erneuter Isolierung von
an ER angereicherten Membranen mittels Flotation verblieb nur
ein Teil des translatierten Proteins an der Position, an der die
Suspension im Gradienten eingefüllt worden war (Fr. Nr. 12).
Etwas LBLOX wanderte zu Dichten, die 33% Saccharose (Fr. Nr. 11)
20 oder 30% Saccharose (Fr. Nr. 9) entsprachen. Kleine Mengen LBLOX
wurden an der Position des glatten ER angetroffen (Fr. Nr. 5-7).

Der Vergleich der Menge an LBLOX-Radioaktivität in den Membranen,
die mittels Gradientenzentrifugation reisoliert worden waren, in
25 einer Reihe von Experimenten verdeutlichte, dass die Verwendung
der Anordnung für den post-translati-
onalen Transport zu Mikro-
somen die gleichen oder etwas höhere Mengen an membrangebundener
LBLOX ergab als die Verwendung des Protokolls für den co-trans-
lati-
onalen Transport (Daten nicht gezeigt). Beim genauen Ver-
30 gleich des Wanderungsverhaltens des LBLOX-Primärtranslatats und
der von den Membranen nach Flotation reisolierten LBLOX wurden
keine erkennbaren Unterschiede in der Molekülmasse gefunden.

PLA-mRNA, die mittels *in vitro*-Transkription von pPAT291 erhalten
35 worden war, wurde ebenfalls translatiert, und das Translations-
produkt, d. h. radioaktiv markierte Phospholipase, wurde mit
Mikrosomen inkubiert. Nach der Flotierung in einem Saccharose-
gradienten wurden die Subfraktionen mittels SDS-PAGE und Fluoro-
graphie analysiert (Fig. 1C). Die Fluorographie ergab, dass ein
40 großer Teil des Translationsproduktes an Mikrosomenmembranen
gebunden hatte.

Die durch die Untersuchung des *in vitro*-Transfers von LBLOX
zu Mikrosomen erhaltenen Ergebnisse (Fig. 1B) wurden durch die
45 Analyse der *in vivo*-Situation bestätigt, indem die Abfolge der
Ereignisse, die beim Transfer von LBLOX zu Lipidkörpern erfolgt,
verfolgt wurde. Durch Anwendung von Pulse-Chase-Experimenten

31

bestimmten wir die Pools, die von der neu synthetisierten LBLOX auf ihrem Weg zu den Lipidkörpern durchquert wurden. So wollten wir herausfinden, ob die Fraktion der ER-Membranen oder des Cytosols der Pool war, in dem die markierte LBLOX zuerst
5 erschien.

Die Fig. 2A (Spur 2) zeigt, dass der Hauptteil der pulsmarkierten LBLOX in der Fraktion erhalten wurde, die das Cytosol enthielt. Eine kleine, aber signifikante Menge der radioaktiven LBLOX
10 wurde kontinuierlich in den Mikrosomen und auch in Mikrosomenfraktionen, die mittels Flotation in Saccharosegradienten weiter gereinigt wurden, gefunden (Fig. 2A). Um die Möglichkeit auszuschließen, dass kleine prozentuale Anteile aller neu synthetisierten Proteine die ER-haltige Fraktion kontaminierten, analysierten wir in der Mikrosomenfraktion die Menge an Proteinen, die
15 entweder cytosolisch waren oder als Artefakt in den cytosolhaltigen Überstand einer 100 000 g-Zentrifugation freigesetzt wurden. Unter Verwendung von Isocitratlyase als stark exprimiertes Gurkenprotein auf dieser Entwicklungsstufe wurde das Vor-
20 liegen dieses Proteins in der Mikrosomenfraktion und im löslichen Überstand mittels Immunfällung bestimmt. Die Fig. 2B zeigt, dass Isocitratlyase im Gegensatz zu LBLOX in der ER-Präparation praktisch fehlte.

Die in Fig. 2A dargestellten Daten zeigen, dass LBLOX das Cytosol als ersten Pool auf ihrem Weg zu den Lipidkörpern durchquert. Es ist auch offensichtlich, dass LBLOX membranbindende Eigenschaften besitzt und partiell vor Proteolyse geschützt ist, wenn sie an die ER-Membran gebunden ist. Trotz Bereichen im LBLOX-Molekül,
30 die Affinität zu Membranen aufweisen, ist ein großer Teil des LBLOX in vitro für chemische Modifikation zugänglich und könnte daher in vivo ins Cytosol ragen. Teil C der Fig. 2 liefert einen Hinweis darauf, in welchem Ausmaß der Teil von LBLOX, der an Mikrosomenmembranen gebunden ist, für proteolytischen Abbau
35 zugänglich ist.

Die LOX-Isoform, die mittels Western-Blot-Analyse an aus Kotyledonen isolierten Mikrosomen nachweisbar ist, ist unseren Befunden zufolge strukturell identisch mit der an Lipidkörper
40 gebundenen LOX-Isoform. Dies wurde durch Vergleich des Fragmentmusters nach eingeschränkter Proteolyse nachgewiesen (Daten nicht gezeigt). Die Art der Bindung von LBLOX an die Mikrosomenmembran entspricht der eines peripher gebundenen Membranproteins. Waschen mit 100 mM $MgCl_2$ entfernte mehr als 90% der markierten LBLOX. Es
45 sollte jedoch betont werden, dass die Bindung von LBLOX an die Mikrosomen in Anwesenheit eines Niedrigsalz-Puffers und auch unter den Bedingungen einer wiederholten Gradientenzentrifugation

32

recht stabil war. Die stabile Bindung wurde auch dadurch gezeigt, dass LOX an Mikrosomen nur partiell für Proteolyse zugänglich war (Fig. 2, Teil C).

- 5 Die Kapazität der Bindung an Mikrosomenmembranen wurde für LBLOX auch unter einer weiteren *in vivo*-Bedingung gezeigt. In einem heterologen System, d. h. grünen Tabakblättern, die LBLOX aus Gurkenkotyledonen exprimierten, führte die hohe Expression von LBLOX zur Bindung erheblicher Mengen LBLOX an Mikrosomen.
- 10 Durch Subfraktionierung des 100 000 x g-Sediments, wobei eine Saccharose-Dichtegradienten-Flotation angewendet wurde, zeigten wir, dass praktisch die gesamte zuvor durch Zentrifugation bei 100 000 x g sedimentierte LBLOX an die flotierten Membranen gebunden blieb. Der Peak der membrangebundenen LBLOX (Fig. 2,
- 15 Teil D) stimmte mit den Markerproteinen für ER-Membranen überein.

- Um unsere Beweiskette für einen direkten post-translationalen Transfer von LBLOX zu den Membranen von Lipidkörpern auszudehnen, untersuchten wir die Affinität von löslicher LBLOX zu Mikrosomen-
- 20 membran *in vitro*. In einem Mischexperiment gaben wir ein Gemisch von radioaktiven cytosolischen Proteinen, die aus Kotyledonen nach Pulsmarkierung isoliert worden waren, (Präp. A) zu einem Überstand eines Extrakts, der aus unmarkierten Kotyledonen präpariert und bei 2000 x g zentrifugiert worden war
- 25 (Präp. B). Durch dieses Verfahren sollte es der radioaktiven LBLOX, die als Vorstufe in der cytosolischen und membranfreien Präparation (Präp. A) enthalten war, möglich sein, post-translational an Mikrosomen-, Lipidkörper und andere Membranen, die im nicht-radioaktiven Extrakt zugegen waren, (Präp. B) zu binden.
- 30 Nach einer kurzen Inkubation isolierten wir Mikrosomen als potentielle Akzeptormembranen für radioaktive LBLOX (Fig. 3A) und Glyoxysomen als Kontrolle (Fig. 3B). Die elektrophoretische Analyse zeigte, dass die cytosolische LBLOX auch unter diesen Bedingungen, die der *in vivo*-Situation ähnelten, an Mikrosomen
- 35 gebunden wurde. LBLOX war in der Glyoxysomenfraktion, die einer abschließenden Reinigung durch Saccharosegradienten-Flotation unterworfen wurde, nicht nachweisbar. Somit bindet lösliche LBLOX an Membranen, aber nicht gleichmäßig an alle Membranen. Z.B. ist die Affinität von LBLOX zu Glyoxysomenmembranen (Fig. 3B)
- 40 mindestens eine Größenordnung niedriger als die nachgewiesene Affinität zu Mikrosomen (Fig. 3A, Spur 3). Daher erfordert die Bindung von LBLOX in Gurkenkotyledonen eine hochgradige Selektivität, da andere Organellen nicht mit LBLOX markiert und nicht für den Abbau modifiziert werden.

Gurken-LBLOX und Sojabohnen-LOX-1 unterscheiden sich in ihrer Affinität zu Liposomen

Um zu testen, ob LBLOX unabhängig von spezifischen Protein-
5 Protein-Wechselwirkungen eine intrinsische Affinität zu Membranlipiden besitzt, wurden die Bindungsstudien ausgedehnt und schlossen Liposomen als Akzeptormembranen ein. Zuerst wurden die Experimente mit rohem Sojabohnenlecithin als Quelle für Phosphatidylcholin durchgeführt. Anschließend wurde Phosphatidyl-
10 cholin mit unterschiedlichem Reinheitsgrad auch in Kombination mit Phosphatidylserin zur Herstellung von Liposomen verwendet. Die Größe der Liposomen wurde durch Vergleich mit MonoQ-Perlen als Standard kontrolliert.

15 Die Ergebnisse des Liposomenexperiments (Fig. 4) zeigen den deutlichen Unterschied zwischen der Membranaffinität von Gurken-LBLOX und derjenigen von Sojabohnen-LOX-1. Während die beiden zuvor den Gurken-Lipidkörpern zugewiesenen Proteine, nämlich LBLOX und PLA, fast quantitativ an die Liposomen gebunden wurden,
20 besaßen die cytosolischen LOX-Formen der Gurke und Sojabohnen-LOX-1 keine Affinität für die Lipidphase. In Kontrollexperimenten mit entweder einem typischen cytosolischen Protein oder mit einem Gemisch, das LBLOX und cytosolische Proteine enthielt und aus Gurkenkotyledonen präpariert worden war, konnte gezeigt werden,
25 dass die Membranaffinität von LBLOX recht einzigartig ist (Daten nicht gezeigt).

Der N-terminale Bereich einschließlich der β -Barrel-Struktur ist wesentlich für die Bindung von LBLOX an Lipidkörper

30 Unter Berücksichtigung der fehlenden proteolytischen Prozessierung und der mit den Bindungsstudien erhaltenen Daten lässt sich die Hypothese aufstellen, dass Domänen eines gefalteten Proteins für den Transfer zu den Membranen verantwortlich sind. Eine
35 solche Domäne wurde wahrscheinlich, als die Aminosäuresequenz von LBLOX in eine Struktur auf der Basis der Kristallstrukturdaten, die für Sojabohnen-LOX-1 bei einer Auflösung von 1,4 Å erhalten worden waren [Frevert, J. & Kindl, H., Eur. J. Biochem. 92, 1998: 35-43], eingepasst wurde. Im Gegensatz zu Sojabohnen-LOX-1 zeigte
40 Gurken-LBLOX nicht nur eine β -Barrel-Struktur kurz stromabwärts des N-terminalen Abschnittes, sondern besaß in dieser Domäne auch eine recht einzigartige Anordnung von Glutamylresten, die zur Koordination von Ca^{2+} verwendet werden könnten (Fig. 5). Dies kann wiederum auf eine Verwandtschaft zwischen dem LBLOX- β -Barrel
45 und den Mitgliedern Ca^{2+} -abhängiger membranbindender Domänen hindeuten.

- Um das Konzept einer einzigen Domäne als Protein-Targeting-Mittel zu untersuchen, wurde eine cDNA konstruiert, die für ein Fusionsprotein aus Glutathion-S-transferase und dem N-terminalen β -Barrel von LBLOX als C-terminalem Abschnitt codierte. Nach der Expression in Bakterien wurde ein 51 kDa großes Protein isoliert, das die 220 Aminosäurereste, die von Glutathion-S-transferase stammen (und die Glutathionbindungsstelle darstellen) und die 224 N-terminalen Aminosäurereste von LBLOX enthielt.
- 10 Es wurde 1 μ g des GST-LBLOX244-Fusionsproteins und eine Lipidkörpersuspension, die 20 μ g Protein entsprach, eingesetzt, und wir beobachteten einen fast quantitativen Transfer des Fusionsproteins zu den Lipidkörpern zusätzlich zu der bereits in den Lipidkörpern vorliegenden LBLOX. Das hohe Ausmaß, in dem das β -Barrel-Fusionsprotein an die Lipidkörperoberfläche gebunden wurde, zeigt, dass entweder das Fusionsprotein gut mit der ursprünglich an die Lipidkörper gebundenen LBLOX konkurrierte oder die Lipidkörperoberfläche nicht vollständig mit LBLOX gesättigt war. Die Fig. 6 fasst die Hinweise darauf zusammen, dass das N-terminale β -Barrel von LBLOX allein für eine sehr effiziente Bindung an Lipidkörper ausreicht. In der Spur 5 ist die Aufnahme der 51 kDa großen Fusionsproteins durch die Lipidkörper dargestellt.
- 25 Zwei cDNA-Konstrukte, LBLOXA51 und LBLOXA96, wurden hergestellt, und nach in vitro-Transkription/Translation wurden die jeweiligen Proteine daraufhin untersucht, ob sie an isolierte Lipidkörper binden. Beide rekombinanten Proteine wurden effizient zu Lipidkörpern transportiert (Daten nicht gezeigt). Diese Experimente wurden entworfen, weil die Analyse von Hydropathie-Plots der LBLOX-Aminosäuresequenz andeutete, dass ein Abschnitt von Aminosäureresten um die Position 710 einen hydrophoben Bereich enthält, der für eine potentielle Membranbindung ausreichend sein könnte. Die Bindungstests waren jedoch positiv und zeigten, dass das Fehlen des Bereichs um 710, wie es in den Konstrukten LBLOXA51 und LBLOXA96 erzeugt worden war, die Effizienz der Bindung von LBLOX an Lipidkörper nicht signifikant verringert. Unter Verwendung der in der Fig. 1B dargestellten in vitro-Assays fanden wir auch, dass radioaktiv markiertes Translatat von LBLOX- Δ 504 zu isolierten Lipidkörpern transportiert wurde. LBLOXA504 bestand nur aus der N-terminalen Hälfte des LBLOX-Moleküls. Dies bestätigt zudem das Konzept, dass der C-terminale Teil von LBLOX, der das aktive Zentrum umfasst, für das Targeting nicht notwendig ist. LBLOXA80N ohne die N-terminale Verlängerung, aber mit dem β -Barrel wurde mit signifikant geringerer Effizienz als LBLOXA504 zu Lipidkörpern transportiert.

35

Indem diese Art der *in vitro*-Experimente ausdehnten wurde, wurde gefunden, dass der Transfer zu den Lipidkörpern auf Ca^{2+} -unabhängige Weise erfolgt (Daten nicht gezeigt). Trotz dieses Ergebnisses wurde die Möglichkeit untersucht, dass die

5 Ca^{2+} -abhängige Bindung von Proteinen an die Lipidkörperoberfläche schließlich zur Bildung einer Ca^{2+} -angereicherten Proteinschicht führen könnte, die die Lipidkörper umgibt. Um die Aufnahme von Ca^{2+} zusammen mit Proteinen, wie LBLOX und PLA, zu untersuchen, untersuchten wir die Bildung von Ca^{2+} -bedeckten Lipidkörpern durch

10 Verabreichung von $^{45}\text{CaCl}_2$ an Korydonen und anschließende Isolation von Zellstrukturen. Die Lipidkörperfraktion enthielt nach Reflotation, Waschen und Behandlung mit 100 mM Na_2CO_3 50 kBq $^{45}\text{Ca}^{2+}$, was etwa 1 nmol entspricht. Die gleiche Präparation wies 2 nmol LBLOX auf. Bei weiterer Behandlung mit 100 mM unmarkiertem

15 CaCl_2 wurden 90% der Radioaktivität von den Lipidkörpern entfernt, wohingegen der Großteil der LBLOX an die Lipidkörper gebunden blieb. Diese Daten stimmen nicht mit der Hypothese überein, dass Ca^{2+} eine Voraussetzung für die Bindung von LBLOX an die Lipidkörperoberfläche ist.

20

Eine erhebliche Veränderung des β -Barrels von LBLOX beseitigt seine Fähigkeit zur Bindung an Liposomen

Zur weiteren Charakterisierung der Art der Wechselwirkung

25 zwischen der Lipidkörperoberfläche und der N-terminalen β -Barrel-Struktur von LBLOX wurde untersucht, ob eine modifizierte β -Barrel-Struktur auch an Liposomen bindet. Dazu wurde ein rekombinantes Protein (LBLOX- HA_3) hergestellt, das im Vergleich zu Wildtyp-LBLOX eine dreifache Hämagglutininmarkierung, inseriert

30 zwischen Aminosäurerest 70 und 71 der LBLOX, enthielt. Diese Konstruktion unterbricht das β -Barrel durch einen Abschnitt von 30 Aminosäureresten.

Die in der Figur 7 gezeigten Liposomenexperimente fassen die

35 Beweise dafür zusammen, dass das N-terminale β -Barrel von LOX allein für ihre Bindung an Membranen ausreicht und die Zerstörung des β -Barrels den Transfer inaktiviert. Wildtyp-LBLOX und das β -Barrel-Fusionsprotein (GST-LOX) binden praktisch quantitativ an die Liposomen, die Insertion eines Peptids in die Barrel-Struktur

40 beseitigt die Membranaffinität.

DISKUSSION

Wenige Isoformen der Lipoxxygenase binden an oder integrieren in

45 die Membranen verschiedener Organellen. In diesen Fällen kann die Funktion der Lipoxxygenase auf die Modifikation der entsprechenden Membran zielen. Die Expression von 15-LOX in Retikulozyten

36

erreicht unmittelbar vor dem Abbau der Organelle ihren Maximalwert [Kühn, H. et al., J. Biol. Chem. 265, 1990: 18351-18361], was auch für die Lipidkörper-LOX bei fettabbauenden Kotyledonen gilt [Feussner, I. et al., Planta 198, 1998: 288-293; Matsui, K. et al., Plant. Physiol. 119, 1999: 1279-1257]. Somit liegt die Funktion der LOX in mehreren eukaryotischen Zelltypen in einem programmierten Organellabbau [van Leyen, K. et al., Nature 395, 1998: 392-395]. Im Fall von LBLOX werden sowohl die Phospholipid-Monolayer als auch der Großteil der Triacylglyceride modifiziert, was zur Bildung von 13-S-Hydroperoxyoctadecadienoyl-Einheiten führt [Feussner, I. et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 92, 1995: 11849-11853; Sturm, A. et al., Eur. J. Biochem., 150, 1998: 461-468], was wiederum die Mobilisierung des Speicherlipids einleitet. Für diese Wirkung der LBLOX kann ihre Bindung an die Ziellmembran eine Voraussetzung sein.

Bindungsexperimente *in vitro* und Zellfraktionierungsuntersuchungen, die die Situation *in vivo* beschreiben, wurden durchgeführt, um die Schritte, die für den gerichteten intrazellulären Transport von LBLOX zu Lipidkörpern notwendig sind, zu charakterisieren. Die Ergebnisse beider experimenteller Ansätze unterstützen das Konzept, dass ein cytosolischer Pool des primären Translationsproduktes existiert und dass der anschließende Transfer zu den Lipidkörpern post-translational erfolgt. Da die Zielorganellen zum Zeitpunkt der Samenkeimung bereits vorhanden sind, hängt somit die Bindung der lipidabbauenden Enzyme, nämlich LBLOX und PLA, an die Organelle hauptsächlich von der transienten Expression der Gene, die die bestimmten Isoformen von LOX und PLA codieren, ab. Die früheren Befunde eines temporären Musters der LOX- Feussner, I. et al., Planta 198, 1998: 288-293[] und PLA- [May, C. et al., Biochim. Biophys. Acta 1393, 1998: 267-276] Expression in Kotyledonen stimmen mit ihrer von der Entwicklungsstufe abhängenden Rolle beim Abbau von Lipidkörperstrukturen überein.

Es ist bemerkenswert, dass die für LBLOX beobachtete Bindung keine transiente, sondern eine stabile Bindung an Mikrosomen und Lipidkörper ist. Die Stärke dieser Bindung wurde durch die Gewinnung von LBLOX mit Lipidkörpern oder Liposomen nach der stringenten Trennung von überschüssigem Liganden und Akzeptormembranen mittels Flotation nachgewiesen. Diese Bindung ist jedoch nicht vergleichbar mit der Integration eines Proteins, das einen langen Abschnitt hydrophober Aminosäurereste enthält, wie sie für die Oleosine, eine andere Form der Lipidkörperproteine, [Hills, M J. et al., Planta 189, 1993: 24-29] gezeigt wurde, sondern sie entspricht eher dem Verhalten peripherer Membranproteine. Im letzteren Fall könnte es nützlich sein zu überlegen,

37

- ob die LBLOX-Bindung aufgrund ihrer Wechselwirkung mit einem integralen Membranprotein als Partner, z. B. mit dem Oleosin als Anker, erfolgt oder ob die Funktion des LBLOX- β -Barrels mit der Funktion einer an die Phospholipidmembran bindenden C2-Domäne, wie für Synaptotagmin [Rizo, J. & Sudhof, T. C. J. Biol. Chem. 273, 1998: 15879-15882] und cytosolische Phospholipase C-Delta [Perisic, O. et al., J. Biol. Chem. 273, 1998: 1596-1604] oder Phospholipase A₂ [Xu, G. Y. et al., J. Mol. Biol. 280, 1998: 485-500] gezeigt, vergleichbar ist. Diese Art des Vergleichs mit C2-Domänen erfordert eine gründliche Untersuchung einer möglichen Wirkung von Ca²⁺ entweder auf die Membranbindungseigenschaften von LBLOX oder auf die Struktur von LBLOX, wie sie für 5-Lipoxygenase gefunden wurde [Hammarberg, T. & Radmark, O., Biochem. 38, 1999: 4441-4447]. Bei unseren Experimenten mit Lipidkörpern wurde eine ⁴⁵Ca²⁺-Beschichtung von Lipidkörpern gefunden, aber es wurde keine Ca²⁺-Abhängigkeit der Bindung von LBLOX-Konstrukten beobachtet. Für einen unzweideutigen Nachweis des Vorliegens oder Fehlens einer Ca²⁺-vermittelten Bindung müssen die experimentellen Protokolle für zukünftige Studien in verschiedener Hinsicht verfeinert werden. Frühere Experimente [Busch, M. B. et al., Eur. J. Cell Biol. 60, 1993: 88-100] mit Wurzelgewebe unter Verwendung von Energiefilter-Elektronenmikroskopie wiesen nach, dass die Lipidkörperoberfläche von einer Zone mit hohem Ca²⁺-Gehalt bedeckt ist.
- Wir sollten uns erinnern, dass der Vergleich der primären Aminosäuresequenzen und der putativen Sekundärstrukturen von LOX-Formen zeigt, dass sich LBLOX nicht nur durch die Ausbildung einer β -Barrel-Struktur, die mit exponierten Glutamylresten ausgestattet ist, sondern auch durch eine N-terminale Verlängerung von 30 Aminosäureresten, die in cytosolischen LOX-Isoformen nicht vorliegt [Höhne, M. et al., Eur. J. Biochem., 241, 1996: 6-11; Rosahl, S., Z. Naturforsch. C 51, 1996: 123-138], auszeichnet. Es ist somit wahrscheinlich, dass beide Arten der Wechselwirkung eine entscheidende Rolle spielen, die N-terminale Verlängerung als spezifisches Motiv und das β -Barrel, das sich in der auf die N-terminale Verlängerung folgenden Aminosäuresequenz befindet, als allgemeines Mittel zur Steigerung der Membranaffinität.
- Unser Experiment mit dem mutanten LBLOX-Protein, das sich vom Wildtyp nur durch eine erhebliche Änderung im β -Barrel, d.h. durch die Insertion von drei Wiederholungen einer HA-Markierung, unterscheidet, zeigten den Verlust der Bindung an Lipidkörper oder Membranen. Dies bedeutet, dass das intakte β -Barrel als wesentlich für die Bindung an Lipidkörper angesehen werden muss,

ungeachtet dessen, ob der am weitesten N-terminal gelegene Bereich zu einer weiteren Selektivität beiträgt.

Targetingsignale als entfaltete Bereiche von Aminosäureresten
5 sind festgestellt worden, wenn Proteine in Mitochondrien, Chloroplasten oder das ER transportiert werden. Hier, im Fall der Bindung eines Proteins an bereits existierende Lipidkörper, kann eine bereits in eine bestimmte Form gefaltete Domäne die Membranbindung bewirken. Es muss ein weiterer Teil postuliert werden,
10 der die Selektivität der Bindung von LBLOX an Lipidkörper vermittelt. Liegt eine große Menge an LBLOX vor, werden außer Lipidkörpern auch das ER und die Golgi-Vesikel mit LBLOX bedeckt. Nimmt jedoch die intrazelluläre Menge an LBLOX ab, besetzen die LBLOX-Moleküle hauptsächlich die Oberfläche von Lipidkörpern.

15

Figurlegenden

Teil A (Fluorogramm) zeigt einen Vergleich des Wanderungsverhaltens von mittels in vitro-Translation hergestellter LBLOX
20 (Spur 1), aus Mikrosomen isolierter LBLOX (Spur 2) und aus Lipidkörpern isolierter LBLOX (Spur 3). Für die Spuren 2 und 3 wurden die entsprechenden zellulären Subfraktionen aus Kotyledonen nach Proteinmarkierung in vivo unter Verwendung von [³⁵S]L-Methionin präpariert. Teil B und C zeigen Fluorogramme, die die post-trans-
25 lationale Bindung an isolierte Gurkenmikrosomen zeigen. Gurkenmikrosomen wurden mit den in Retikulozytenlysaten unter Verwendung von entweder LBLOX-mRNA oder PLA-mRNA hergestellten, radioaktiv markierten Proteinen inkubiert und anschließend durch Flotation in einem Dichtegradienten gereinigt. Die membrange-
30 bundene Lipidkörperlipoxygenase (Teil B) oder Phospholipase (Teil C), die nach Flotation erhalten wurden, sind auf der linken Seite dargestellt. Spur 1 bei B und C entspricht dem oberen Abschnitt des Saccharosegradienten, wohingegen Spur 12 (bei B) und Spur 13 (bei C) dem Boden entsprechen und die nicht an Membranen ge-
35 bundenen (nicht flotierten) Proteine darstellen, die an der Position verbleiben, an der das Inkubationsgemisch vor der Zentrifugation unter den Gradienten geschichtet wurde.

Fig. 2. Ergebnisse der Pulsmarkierung von Proteinen in Koty-
40 ledonen, die auf eine schwache Bindung von LBLOX an Mikrosomen, aber einen erheblichen LBLOX-Pool im Cytosol hinweisen.

Nach einem kurzen Zeitraum (15 min), der zur Verabreichung der radioaktiven Aminosäure als Vorstufe an die Kotyledonen verwendet
45 wurde, wurde eine Zellfraktionierung durchgeführt, und zwei Proteine wurden aus den zellulären Subfraktionen mittels Immundefällung isoliert. Die Isolation der radioaktiven Proteine aus den

39

solubilisierten Subfraktionen erfolgt nach der Zugabe von 1 µg des entsprechenden kalten Proteins (LBLOX oder Isocitratlyase, ICL) als Träger mittels Zugabe von Antiserum und direkter Fällung (s. Methoden). Nach Elektrophorese und Proteinfärbung (Spur 3: 5 Mikrosomen; Spur 4: Cytosol) zeigte das Fluorogramm (Spuren 1 und 2) in Teil A, dass LOX im Cytosol stark (Spure 2) und wesentlich schwächer in den Mikrosomen (Spur 1) markiert war. Teil B: Als Kontrolle wurde die Verteilung der Isocitratlyase zwischen diesen beiden Fraktionen bestimmt. Die Spur 1 (Mikrosomen) und Spur 2 10 ("Cytosol") zeigen Fluorogramme, wohingegen die Spuren 3 und 4 die Proteinfärbungen darstellen. Spur 1 (und die entsprechende Proteinfärbung in der Spur 3) zeigt das Fehlen einer Kontamination von Isocitratlyase in den Mikrosomen. Teil C: Behandlung markierter Mikrosomen (analysiert wie im Teil A, Spur 1) mit 15 Proteinase K. Nach der Proteolyse wurden Phenylmethylsulfonylfluorid und 1 µg des entsprechenden kalten Proteins zugegeben, und eine Immunfällung wurde durchgeführt. Die Spuren 1 bis 4 zeigen Fluorogramme: unbehandelten Mikrosomen in Spur 1; unbehandeltes Cytosol in Spur 2; behandelte Mikrosomen in Spur 3; 20 behandeltes Cytosol in Spur 4. Teil D: Lokalisierung der Gurken-LBLOX an Mikrosomen aus transgenen Tabakpflanzen. Nach der Flotation der Membranen in einem linearen Saccharosedichtegradienten wurden Subfraktionen mittels Immunblot analysiert. Spur 1 entspricht dem oberen Abschnitt des Zentrifugenröhrchens (23 % 25 Saccharose), Spur 3 (32 % Saccharose), Spur 5 (39 % Saccharose), Spur 6 (41 % Saccharose) und Spur 7 (Probe bei 43 % Saccharose eingefüllt).

Fig. 3: *In vitro*-Experimente, die zeigen, dass radioaktiv 30 markierte cytosolische LBLOX schwach an Mikrosomenmembranen bindet (Teil A) aber praktisch nicht an Glyoxysomen bindet (Teil B).

Teil A: 1 g Kotyledonen wurde mit 9 MBq [³⁵S]L-Methionin 3 Std. 35 inkubiert. Dann wurde ein 100 000 g-Überstand, der radioaktiv markierte cytosolische LBLOX enthielt, hergestellt. Diese Präparation wurde mit einem aus unbehandelten Kotyledonen hergestellten Homogenat gemischt. Die ER/Golgi-Fraktion wurde durch anschließende Gradientenzentrifugation isoliert. Ein Aliquot 40 (1/20) der ER/Golgi-Fraktion (Spur 1) und ein Aliquot (1/20) des reisolierten Cytosols (Spur 2) sowie ein großes Aliquot (1/2) der ER/Golgi-Fraktion (Spur 3) wurden einer SDS-PAGE und Fluorographie unterworfen. Teil B: In einem ähnlichen Mischexperiment wurden isolierte unmarkierte Glyoxysomen mit dem aus *in vivo*- 45 markierten Kotyledonen präparierten radioaktiven Cytosol inkubiert. Die anschließende Reisolation der Glyoxysomen und Glyoxysomenmembranen wurde mittels Flotation in einem Saccharose-

gradienten durchgeführt. Dazu wurde das Inkubationsgemisch auf 60% (Gew./Gew.) Saccharose eingestellt. Ein Gradient (56 bis 38 % Saccharose) wurde auf die Probe geschichtet. Nach einer Zentrifugation bei 27000 U/min für 15 Std. in einem Beckman-SW-28-Rotor wurden die Fraktionen mittels SDS-PAGE und Fluorographie analysiert. Die Position der markierten LBLOX im Fluorogramm ist durch einen Pfeil angezeigt. Die Spuren entsprechen den folgenden Fraktionen (Gleichgewichtsdichten in Klammern): Spur 4 (48 % Saccharose), Spur 5 (48,5 % Saccharose), Spur 6 (49 % Saccharose), Spur 7 (50,5 % Saccharose), Spur 8 (452,5 % Saccharose), Spur 24 (56 % Saccharose), Spur 25 (56,5 % Saccharose), Spur 26 (58 % Saccharose), Spur 27 (59% Saccharose) und Spur 28 (59 % Saccharose). Die Nummern der Fraktionen 25-28 entsprechen der Position im Gradienten, an der die Suspension vor der Zentrifugation eingefüllt wurde. Die Spuren 4-5 umfassen die Glyoxysomenmembranen, und die Spur 8 enthält dem Proteinprofil zufolge die Glyoxysomen.

Fig. 4. Affinität von in Bakterien exprimierter LBLOX und PLA zu Liposomen.

In 200 µl Puffer wurde 1 µg der entsprechenden Proteine mit einer Menge an Liposomen inkubiert, die 1 mg Phosphatidylcholin entsprach. Nach 30 min wurde das Gemisch auf 42% Saccharose eingestellt und in einen Saccharosegradienten geschichtet. Die Flotation erfolgte durch Zentrifugation bei 100000 g für 6 Std. Die Proteine in den aus dem Gradienten erhaltenen Subfraktionen wurden mittels SDS-PAGE und Immunblots analysiert. Zur Immunmarkierung wurden entsprechende Antiseren, die entweder gegen LBLOX oder gegen das Patatin-ähnliche Protein hergestellt worden waren, verwendet. Die ganz rechten Spuren zeigen immer den Boden, an dem das Inkubationsgemisch vor der Zentrifugation unter den Gradienten geschichtet wurde. Somit erfolgte die Flotation von rechts nach links.

35

Fig. 5. Schematische Darstellung der LBLOX-Struktur und ihres N-terminalen Abschnitts (Aminosäurereste 48-244), die das β -Barrel aufweist.

Die Struktur der LBLOX wurde auf der Grundlage der für Sojabohnen-LOX-1 erhaltenen Kristallstrukturdaten [21] unter Verwendung der Primärsequenz der LBLOX berechnet. Im oberen Teil der Figur sind der N-Terminus und das ausschließlich aus β -Faltblättern bestehende β -Barrel unten rechts etwas gesondert dargestellt. Der Hauptteil der LOX, der das aktive Zentrum am C-Terminus umfasst, wird von α -Helices dominiert. Der untere Teil der Figur stellt eine vergrößerte Ansicht des N-terminalen

41

β-Barrels dar. Die 40 Aminosäurereste des äußersten N-Terminus, eine in anderen LOX-Strukturen nicht gefundene Verlängerung, sind nicht dargestellt. Die unten rechts mit Pfeilen markierte unterbrochene Struktur zeigt eine Stelle, an der die Aminosäuresequenz 5 der LBLOX erheblich von derjenigen der Sojabohnen-LOX-1 abweicht. Das angewendete Programm (Swiss 3D model, Expasy-Server) ergab hier, ähnlich wie bei LOX-1, eine hochflexible Schleife und somit eine undefinierte Struktur. Diese Schleife besteht in LOX-1 aus 14 Aminosäureresten, umfasst bei LBLOX aber 20 Aminosäurereste. 10 Die beiden Glutamyreste E59 und E70 sind einzigartig und werden nur in LBLOX und nicht in Sojabohnen-LOX-1 gefunden. Diese Stelle kann eine Rolle bei der Ca²⁺-koodinierten Membranassoziation spielen.

15 Fig. 6. In vitro-Bindung des GST-LBLOX244-Fusionsproteins an isolierte Lipidkörper.

Das affinitätsgereinigte Fusionsprotein GST-LBLOX244 wurde zu einer Suspension von Lipidkörpern in angereichertem Cytosol 20 gegeben. Nach der Inkubation wurden die Lipidkörper mittels Flotation von den löslichen Proteinen abgetrennt. Aliquote beider Fraktionen sowie der ursprünglichen rohen Lipidkörperfraktion (Spuren 3 und 6) wurden mittels SDS-PAGE und anschließend Immunblot unter Verwendung von anti-LBLOX-Antiserum analysiert. 25 Spuren 2 und 5: durch Flotation gewonnene Lipidkörper; Spuren 1 und 4: reisolierte lösliche Proteine. Der auf die Bande bei 51 kDa deutende Pfeil zeigt das Fusionsprotein, das zusätzlich zur endogenen LBLOX an Lipidkörper gebunden hat. Spuren 1-3: Proteinfärbung; Spuren 4-6: Immunmarkierung.

30

Fig. 7. Bindung von LBLOX-Konstrukten und rekombinanten Proteinen mit Wildtyp- und verändertem β-Barrel an Liposomen.

Nach der Inkubation der gereinigten rekombinanten Proteine mit 35 Liposomen wurden die Liposomen aus dem Inkubationsgemisch mittels Flotation in einem Saccharosegradienten reisoliert. Das Verhalten von Wildtyp-Lipidkörper-LOX (LBLOX) wurde verglichen mit dem eines Fragmentes, das die N-terminale Hälfte von LBLOX enthielt (LBLOX-Δ504), mit dem Fusionsprotein mit dem β-Barrel (GST-LOX) 40 sowie mit einer LBLOX, deren N-terminales β-Barrel erheblich verändert worden war (LBLOX-HA₃). Die Figur zeigt die Analyse von Gradientenfraktionen mittels SDS-PAGE und Immunmarkierung unter Verwendung von anti-LBLOX-Antiserum.

45

42

Abkürzungen. Hämagglutinin, HA; Glutathion-S-transferase, GST; Lipidkörperlipoxygenase, LBLOX; Lipoxygenase, LOX; Phospholipase A₂, PLA.

5 Enzyme. Glutathion-S-transferase (EC 2.5.1.18); Isocitratlyase (EC 4.1.3.1); Lipoxygenase (EC 1.13.11.12); Phospholipase A₂ (EC 3.1.4.3).

10

15

20

25

30

35

40

45

Patentansprüche

1. Isolierte Nukleinsäuresequenz, die für ein Polypeptid codiert
5 und die aus einer Kombination der Nukleinsäuresequenzen einer Biosynthesenukleinsäuresequenz des Fettsäure- oder Lipidstoffwechsels mit einer der folgenden Nukleinsäuren zusammengesetzt wird:
- 10 a) einer Nukleinsäuresequenz mit der in SEQ ID NO: 1 dargestellten Sequenz,
- b) Nukleinsäuresequenzen, die sich als Ergebnis des degenerierten genetischen Codes von der in SEQ ID NO: 1
15 dargestellten Nukleinsäuresequenz ableiten,
- c) Derivate der in SEQ ID NO: 1 dargestellten Nukleinsäuresequenz, die für Polypeptide mit der in SEQ ID NO: 2 dargestellten Aminosäuresequenzen codieren und mindestens
20 60 % Homologie auf Aminosäureebene aufweisen,
- d) einer Nukleinsäuresequenz mit der in SEQ ID NO: 3 dargestellten Sequenz oder des Aminoterminalen Teils des kodierenden Bereichs dieser Sequenz.
- 25 2. Isolierte Nukleinsäuresequenz nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß als Biosynthesegen-Nukleinsäuresequenz des Fettsäure- oder Lipidstoffwechsels eine Sequenz der folgenden Protein-Gruppen verwendet wird:
- 30 Acyl-CoA-Dehydrogenase(n), Acyl-ACP[= acyl carrier protein]-Desaturase(n), Acyl-ACP-Thioesterase(n), Fettsäure-Acyl-Transferase(n), Fettsäure-Synthase(n), Fettsäure-Hydroxylase(n), Acetyl-Coenzym A-Carboxylase(n), Acyl-Coenzym A-Oxidase(n), Fettsäure-Desaturase(n), Fettsäure-Acetylenasen,
35 Lipoxxygenasen, Triacylglycerol-Lipasen, Allenoxid-Synthasen, Hydroperoxid-Lyasen oder Fettsäure-Elongase(n).
3. Isolierte Nukleinsäuresequenz nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß als Biosynthesegen-Nukleinsäuresequenz
40 des Fettsäure- oder Lipidstoffwechsels eine Sequenz der folgenden Protein-Gruppen verwendet wird:
Fettsäure-Acyl-Transferase(n), $\Delta 4$ -Desaturase, $\Delta 5$ -Desaturase, $\Delta 6$ -Desaturase, $\Delta 9$ -Desaturase, $\Delta 12$ -Desaturase, $\Delta 15$ -Desaturase
oder eine Fettsäure-Elongase.

4. Isolierte Nukleinsäuresequenz nach den Ansprüchen 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß die unter (c) genannten Derivate auf Aminosäureebene eine Homologie von 70 %, bevorzugt 80 %, besonders bevorzugt von 90 % über den gesamten Bereich der in
5 SEQ ID NO: 2 dargestellten Sequenz haben (Programm PileUp, J. Mol. Evolution., 25, 351-360, 1987, Higgins et al., CABIOS, 5 1989: 151 - 153).
5. Aminosäuresequenz codiert durch eine Nukleinsäuresequenz
10 gemäß Anspruch 1.
6. Nukleinsäurekonstrukt enthaltend eine Nukleinsäuresequenz gemäß Anspruch 1, wobei die Nukleinsäuresequenz mit einem oder mehreren Regulationssignalen verknüpft ist.
15
7. Verwendung einer Nukleinsäuresequenz gemäß Anspruch 1 oder eines Nukleinsäurekonstrukt gemäß Anspruch 6 zur Herstellung von transgenen Pflanzen.
- 20 8. Vektor enthaltend eine Nukleinsäuresequenz gemäß Anspruch 1 oder ein Nukleinsäurekonstrukt gemäß Anspruch 6.
9. Vektor nach Anspruch 8, wobei es sich bei dem Vektor um lineare oder zirkuläre DNA, Phagen, Viren, Transposons, IS-Elemente, Phasmide, Phagemide, Cosmide oder Plasmide
25 handelt.
10. Organismus enthaltend mindestens eine Nukleinsäuresequenz gemäß Anspruch 1, mindestens ein Nukleinsäurekonstrukt gemäß
30 Anspruch 6 oder mindestens einen Vektor gemäß Anspruch 8.
11. Organismus nach Anspruch 10, wobei es sich bei dem Organismus um einen eukaryontischen Organismus handelt.
- 35 12. Organismus nach Anspruch 10 oder 11, wobei es sich bei dem Organismus um eine Pflanze, einen eukaryontischen Mikroorganismus oder ein Tier handelt.
13. Organismus nach den Ansprüchen 10 bis 12, wobei es sich bei
40 dem Organismus um eine Pflanze, einen Pilz oder eine Hefe handelt.
14. Organismus nach den Ansprüchen 10 bis 13, wobei es sich bei dem Organismus um *Yarrowia lypolytica*, *Saccharomyces cereviseae*, *Traustochytrium*, *Arabidopsis thaliana*, *Brassica napus* oder *Linum usitatissimum* handelt.
45

15. Transgene Pflanze enthaltend eine Nukleinsäuresequenz gemäß Anspruch 1 oder ein Nukleinsäurekonstrukt gemäß Anspruch 6.
16. Verfahren zum Targeting von an der Biosynthese von Lipiden oder Fettsäuren beteiligten Proteinen in Liposomen oder Lipidkörpern, dadurch gekennzeichnet, daß man die für die Proteine kodierenden Nukleinsäuren mit einer der folgenden Sequenzen in einer gemeinsamen Protein kodierenden Sequenz kombiniert:
- a) einer Nukleinsäuresequenz mit der in SEQ ID NO: 1 dargestellten Sequenz,
 - b) Nukleinsäuresequenzen, die sich als Ergebnis des degenerierten genetischen Codes von der in SEQ ID NO: 1 dargestellten Nukleinsäuresequenz ableiten,
 - c) Derivate der in SEQ ID NO: 1 dargestellten Nukleinsäuresequenz, die für Polypeptide mit der in SEQ ID NO: 2 dargestellten Aminosäuresequenzen codieren und mindestens 60 % Homologie auf Aminosäureebene aufweisen,
 - d) einer Nukleinsäuresequenz mit der in SEQ ID NO: 3 dargestellten Sequenz oder des Aminoterminalen Teils des kodierenden Bereichs dieser Sequenz, und
- und die erhaltene Sequenz in einen eukaryontischen Organismus einbringt.
17. Verfahren zum Targeting von an der Biosynthese von Lipiden oder Fettsäuren beteiligten Proteinen in Liposomen oder Lipidkörpern, dadurch gekennzeichnet, daß man mindestens eine Nukleinsäuresequenz gemäß Anspruch 1 oder mindestens ein Nukleinsäurekonstrukt gemäß Anspruch 6 in einen Öl produzierenden Organismus bringt.
18. Verfahren zur Herstellung von Fettsäuren oder Lipiden dadurch gekennzeichnet, daß man mindestens eine Nukleinsäuresequenz gemäß Anspruch 1 oder mindestens ein Nukleinsäurekonstrukt gemäß Anspruch 6 in einen Öl produzierenden Organismus bringt, diesen Organismus anzieht und daß in dem Organismus enthaltene Öl isoliert.

46

19. Verfahren zur Herstellung von Fettsäuren dadurch gekennzeichnet, daß man mindestens eine Nukleinsäuresequenz gemäß Anspruch 1 oder mindestens ein Nukleinsäurekonstrukt gemäß Anspruch 6 in einen Öl produzierenden Organismus bringt, diesen Organismus anzieht und daß in dem Organismus enthaltene Öl isoliert und die Fettsäuren freisetzt.
20. Verfahren nach den Ansprüchen 16 bis 19, dadurch gekennzeichnet, daß es sich bei dem Organismus um eine Pflanze oder einen eukaryontischen Mikroorganismus handelt.

15

20

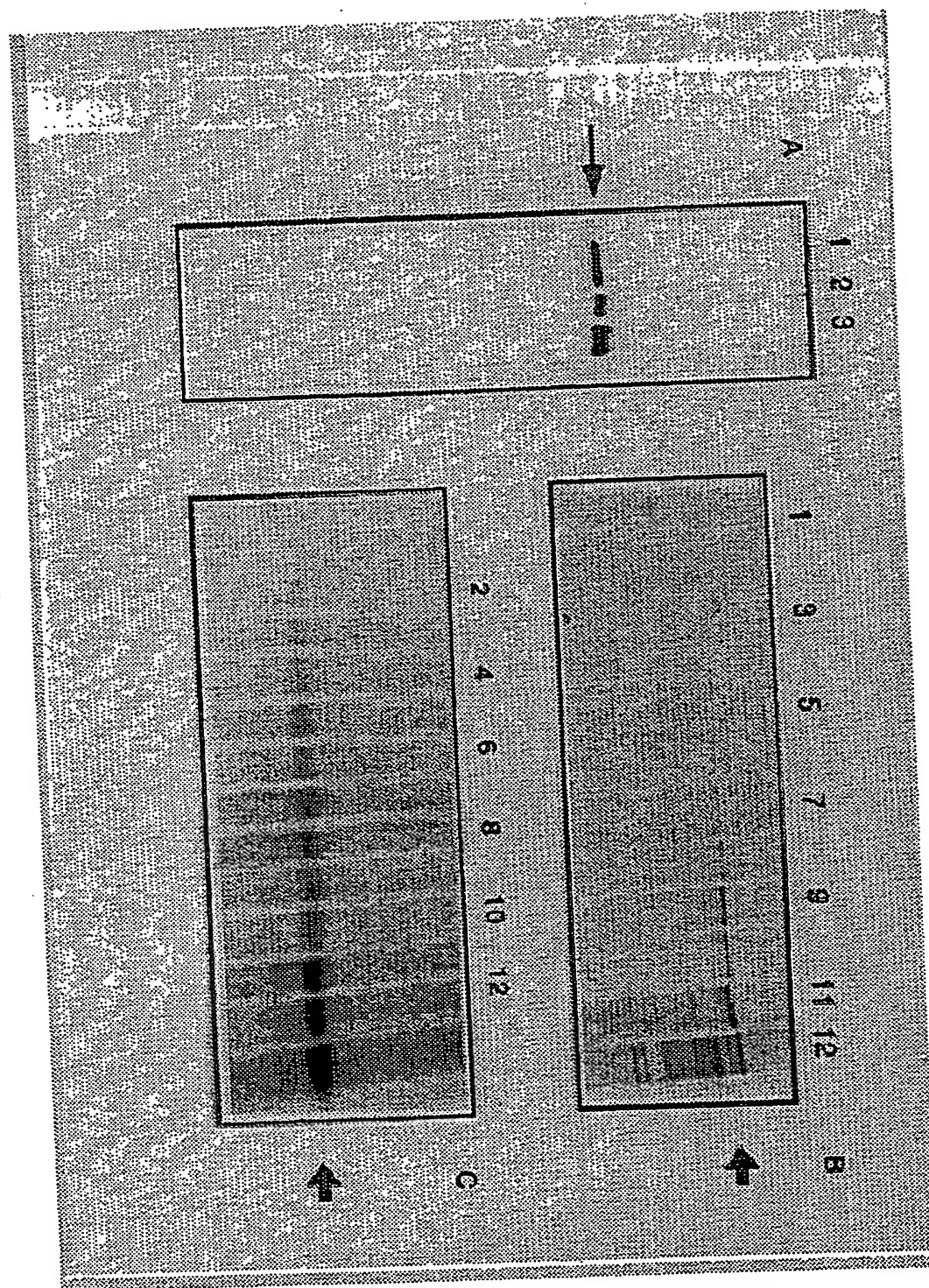
25

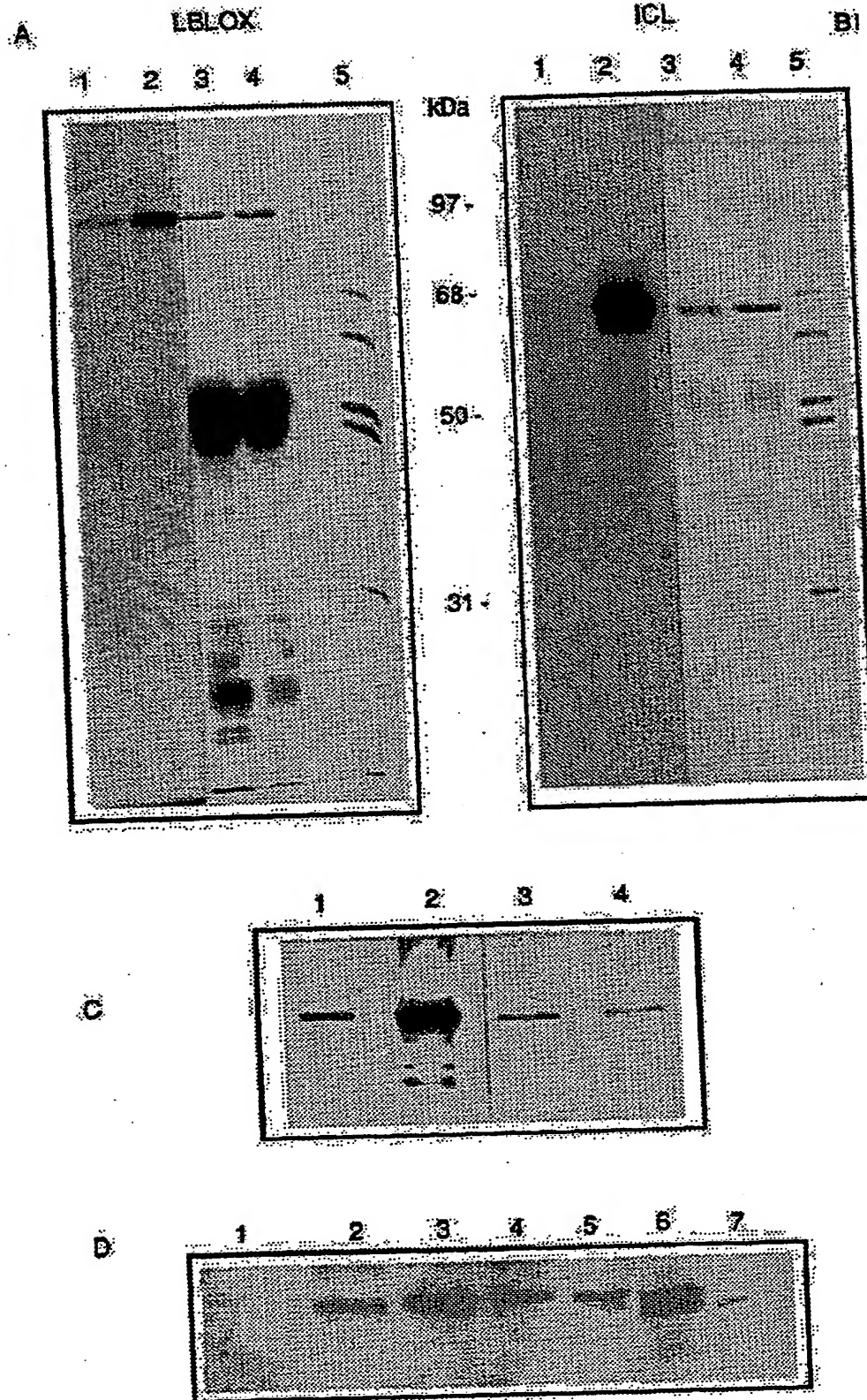
30

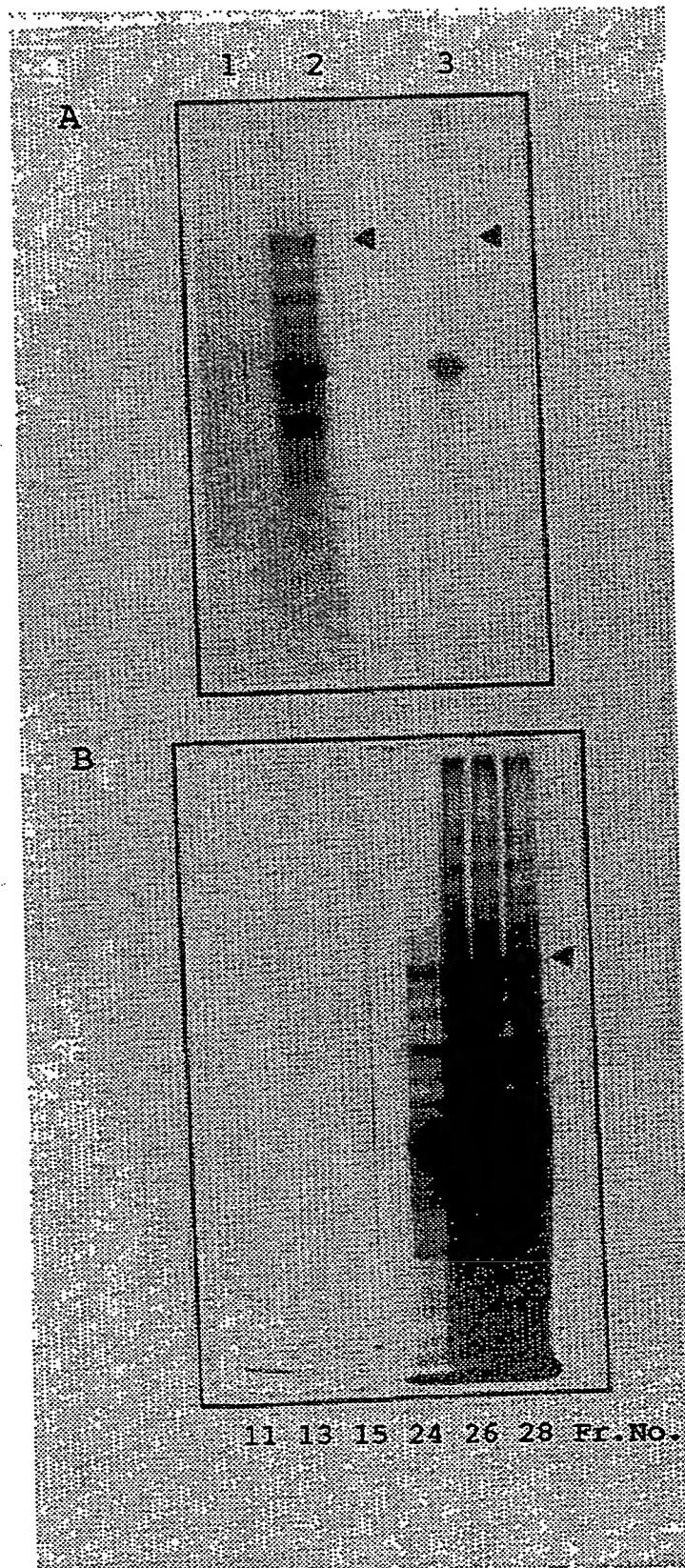
35

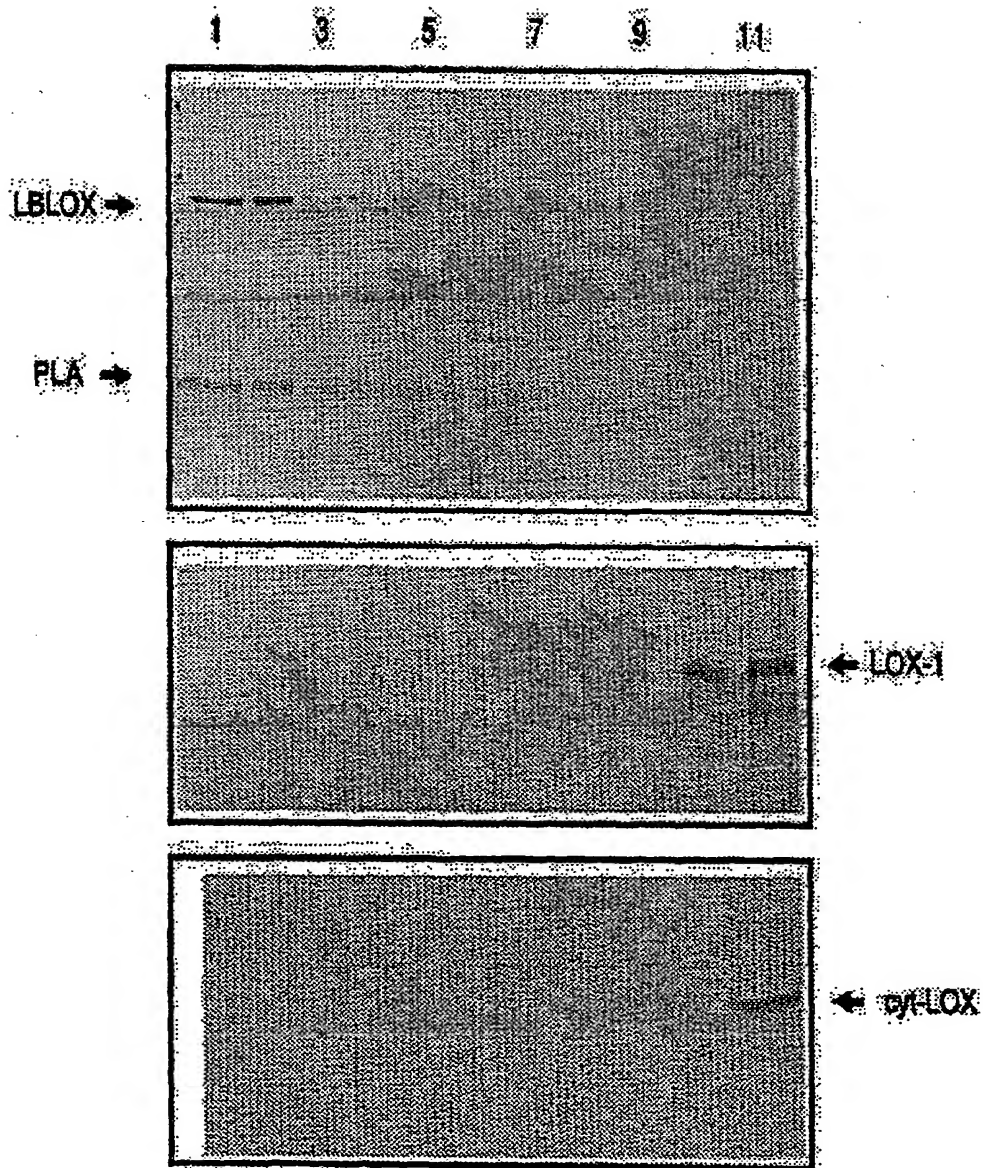
40

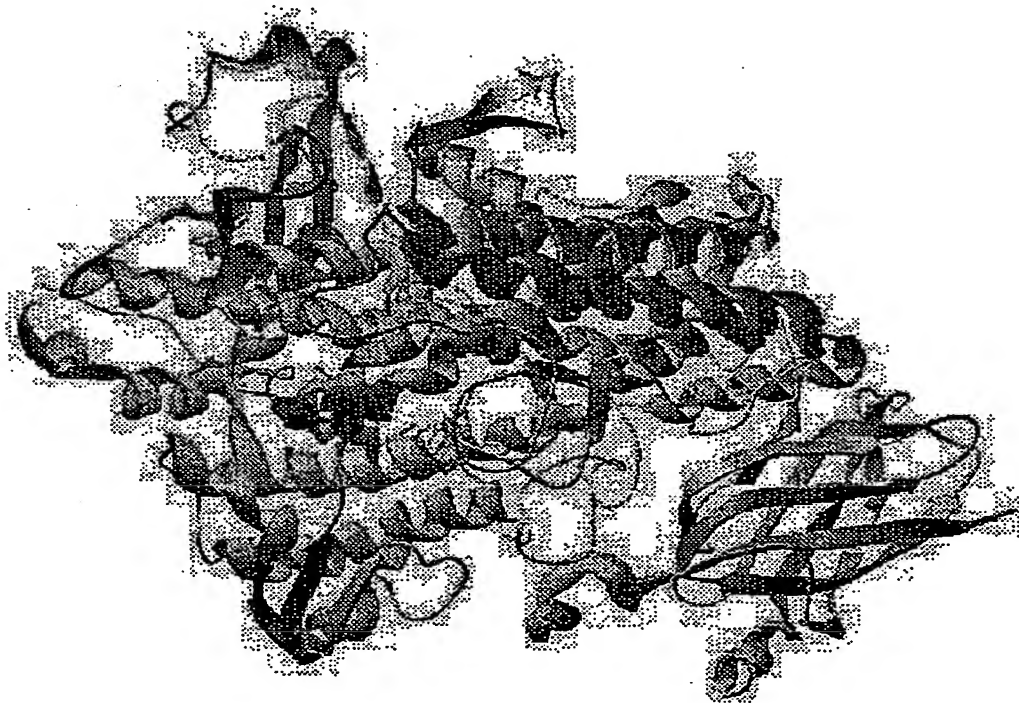
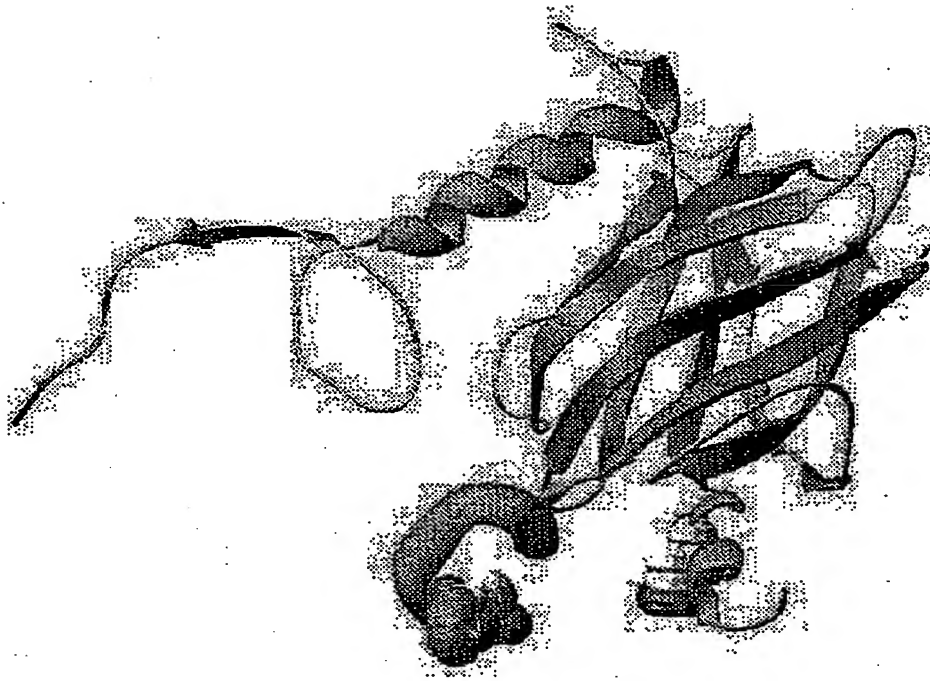
45

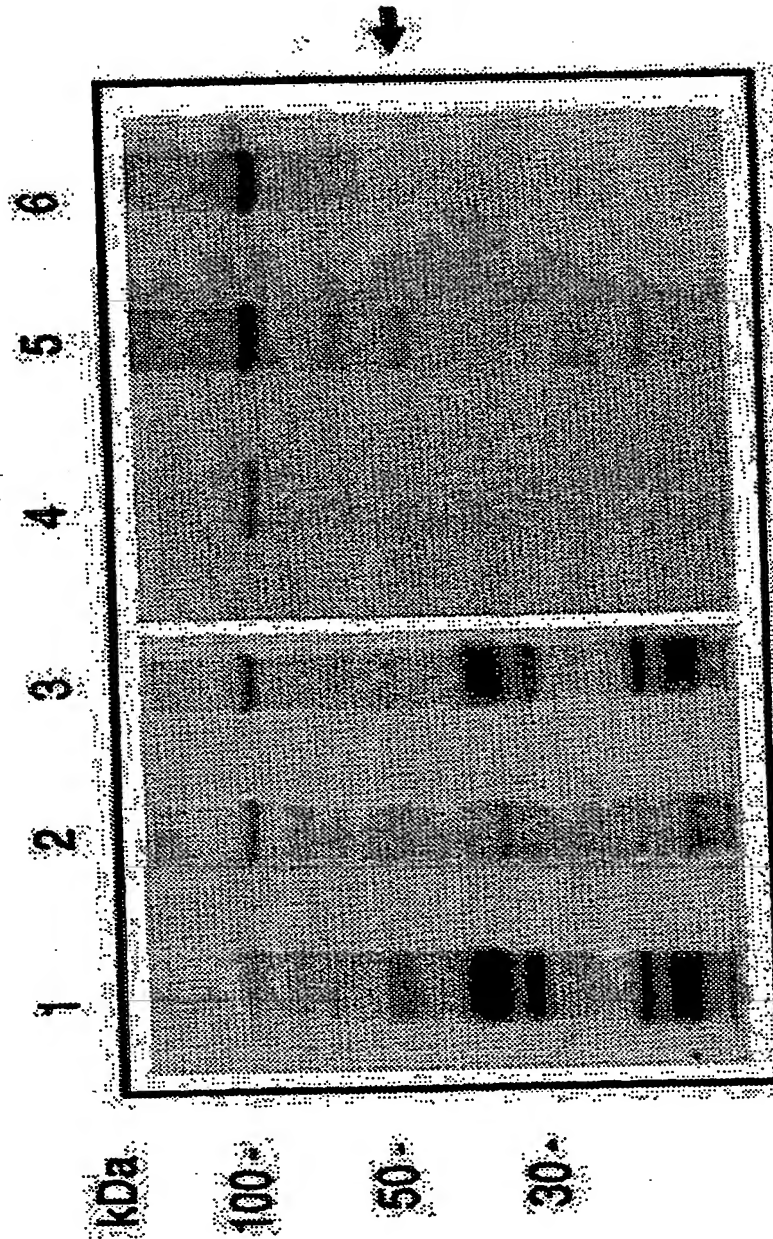


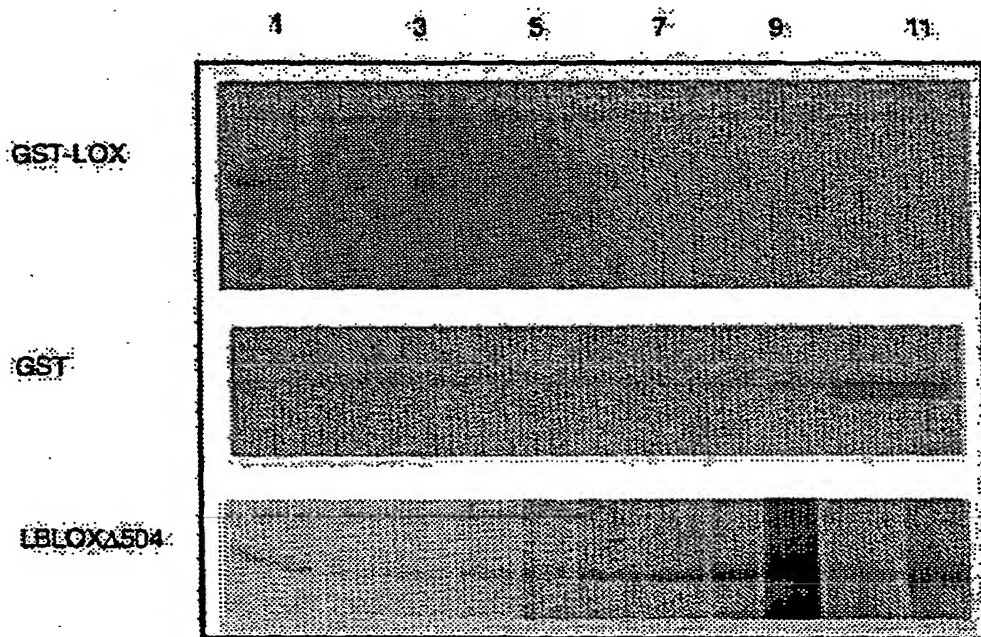
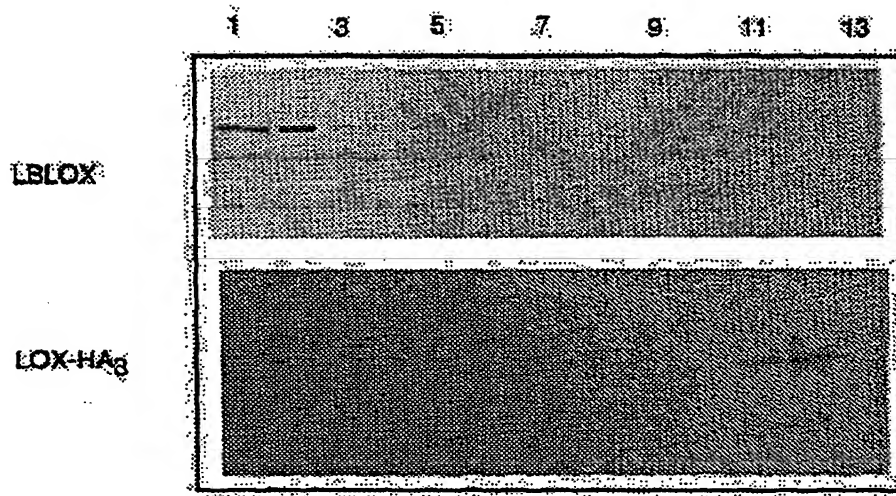












1

SEQUENZPROTOKOLL

<110> BASF Aktiengesellschaft

<120> The N-terminal β -barrel structure of lipid body
lipooxygenase mediates its binding to liposomes and
lipid bodies

<130> 99_1235

<140>

<141>

<160> 4

<170> PatentIn Vers. 2.0

<210> 1

<211> 732

<212> DNA

<213> Cucumis sativus

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(732)

<400> 1

atg ttt gga att ggg aag aac atc att gaa ggg gcc ttg aat aca act	48
Met Phe Gly Ile Gly Lys Asn Ile Ile Glu Gly Ala Leu Asn Thr Thr	
1 5 10 15	

gga gat ctt gca ggt tct gtt atc aat gct ggt ggt aac att tta gat	96
Gly Asp Leu Ala Gly Ser Val Ile Asn Ala Gly Gly Asn Ile Leu Asp	
20 25 30	

aga gtt tcc agt ctt gga gga aac aaa atc aaa ggg aaa gtg att ctt	144
Arg Val Ser Ser Leu Gly Gly Asn Lys Ile Lys Gly Lys Val Ile Leu	
35 40 45	

atg aga agc aat gtt ttg gat ttc act gaa ttt cat tcc aat ctt ctt	192
Met Arg Ser Asn Val Leu Asp Phe Thr Glu Phe His Ser Asn Leu Leu	
50 55 60	

gat aac ttc act gag ctc ttg ggt ggt ggt gtt tct ttc caa ctc att	240
Asp Asn Phe Thr Glu Leu Leu Gly Gly Gly Val Ser Phe Gln Leu Ile	
65 70 75 80	

agt gcc act cat act tca aat gac tca aga ggg aaa gtt ggg aac aag	288
Ser Ala Thr His Thr Ser Asn Asp Ser Arg Gly Lys Val Gly Asn Lys	
85 90 95	

2

gca tat ttg gag agg tgg cta act tca atc cca cca ctg ttt gct gga 336
 Ala Tyr Leu Glu Arg Trp Leu Thr Ser Ile Pro Pro Leu Phe Ala Gly
 100 105 110

gaa tca gtg ttc caa atc aac ttt caa tgg gat gaa aat ttt gga ttt 384
 Glu Ser Val Phe Gln Ile Asn Phe Gln Trp Asp Glu Asn Phe Gly Phe
 115 120 125

cca gga gct ttc ttc ata aaa aat gga cat aca agt gaa ttc ttt ctc 432
 Pro Gly Ala Phe Phe Ile Lys Asn Gly His Thr Ser Glu Phe Phe Leu
 130 135 140

aaa tct ctc act ctt gat gat gtt cct ggc tat ggc aga gtc cat ttt 480
 Lys Ser Leu Thr Leu Asp Asp Val Pro Gly Tyr Gly Arg Val His Phe
 145 150 155 160

gat tgc aat tct tgg gtt tac cct tct gga aga tac aag aaa gat cgc 528
 Asp Cys Asn Ser Trp Val Tyr Pro Ser Gly Arg Tyr Lys Lys Asp Arg
 165 170 175

att ttc ttt gcc aat cat gtt tat ctt cca agt caa aca cca aac cct 576
 Ile Phe Phe Ala Asn His Val Tyr Leu Pro Ser Gln Thr Pro Asn Pro
 180 185 190

ctt cgt aag tat aga gag gaa gaa ttg tgg aat ttg aga gga gat gga 624
 Leu Arg Lys Tyr Arg Glu Glu Glu Leu Trp Asn Leu Arg Gly Asp Gly
 195 200 205

aca gga gaa aga aag gaa tgg gat aga att tat gac tat gat gtt tat 672
 Thr Gly Glu Arg Lys Glu Trp Asp Arg Ile Tyr Asp Tyr Asp Val Tyr
 210 215 220

aat gac att gct gac cct gat gtt ggt gat cat cgt cct att ctc ggt 720
 Asn Asp Ile Ala Asp Pro Asp Val Gly Asp His Arg Pro Ile Leu Gly
 225 230 235 240

ggg acg acc gaa 732
 Gly Thr Thr Glu

<210> 2

<211> 244

<212> PRT

<213> Cucumis sativus

<400> 2

Met Phe Gly Ile Gly Lys Asn Ile Ile Glu Gly Ala Leu Asn Thr Thr
 1 5 10 15

Gly Asp Leu Ala Gly Ser Val Ile Asn Ala Gly Gly Asn Ile Leu Asp
 20 25 30

3

Arg Val Ser Ser Leu Gly Gly Asn Lys Ile Lys Gly Lys Val Ile Leu
 35 40 45
 Met Arg Ser Asn Val Leu Asp Phe Thr Glu Phe His Ser Asn Leu Leu
 50 55 60
 Asp Asn Phe Thr Glu Leu Leu Gly Gly Gly Val Ser Phe Gln Leu Ile
 65 70 75 80
 Ser Ala Thr His Thr Ser Asn Asp Ser Arg Gly Lys Val Gly Asn Lys
 85 90 95
 Ala Tyr Leu Glu Arg Trp Leu Thr Ser Ile Pro Pro Leu Phe Ala Gly
 100 105 110
 Glu Ser Val Phe Gln Ile Asn Phe Gln Trp Asp Glu Asn Phe Gly Phe
 115 120 125
 Pro Gly Ala Phe Phe Ile Lys Asn Gly His Thr Ser Glu Phe Phe Leu
 130 135 140
 Lys Ser Leu Thr Leu Asp Asp Val Pro Gly Tyr Gly Arg Val His Phe
 145 150 155 160
 Asp Cys Asn Ser Trp Val Tyr Pro Ser Gly Arg Tyr Lys Lys Asp Arg
 165 170 175
 Ile Phe Phe Ala Asn His Val Tyr Leu Pro Ser Gln Thr Pro Asn Pro
 180 185 190
 Leu Arg Lys Tyr Arg Glu Glu Glu Leu Trp Asn Leu Arg Gly Asp Gly
 195 200 205
 Thr Gly Glu Arg Lys Glu Trp Asp Arg Ile Tyr Asp Tyr Asp Val Tyr
 210 215 220
 Asn Asp Ile Ala Asp Pro Asp Val Gly Asp His Arg Pro Ile Leu Gly
 225 230 235 240
 Gly Thr Thr Glu

<210> 3

<211> 2964

<212> DNA

<213> Cucumis sativus

<220>

<221> CDS

<222> (48)..(2684)

<400> 3

```

gttcctaaaca cacagtgcgc aaaaaagaaa agtaaaaaag agtgaaa atg ttt gga 56
                                     Met Phe Gly
                                     1

att ggg aag aac atc att gaa ggg gcc ttg aat aca act gga gat ctt 104
Ile Gly Lys Asn Ile Ile Glu Gly Ala Leu Asn Thr Thr Gly Asp Leu
      5                      10                      15

gca ggt tct gtt atc aat gct ggt ggt aac att tta gat aga gtt tcc 152
Ala Gly Ser Val Ile Asn Ala Gly Gly Asn Ile Leu Asp Arg Val Ser
  20                      25                      30                      35

agt ctt gga gga aac aaa atc aaa ggg aaa gtg att ctt atg aga agc 200
Ser Leu Gly Gly Asn Lys Ile Lys Gly Lys Val Ile Leu Met Arg Ser
                      40                      45                      50

aat gtt ttg gat ttc act gaa ttt cat tcc aat ctt ctt gat aac ttc 248
Asn Val Leu Asp Phe Thr Glu Phe His Ser Asn Leu Leu Asp Asn Phe
      55                      60                      65

act gag ctc ttg ggt ggt ggt gtt tct ttc caa ctc att agt gcc act 296
Thr Glu Leu Leu Gly Gly Gly Val Ser Phe Gln Leu Ile Ser Ala Thr
      70                      75                      80

cat act tca aat gac tca aga ggg aaa gtt ggg aac aag gca tat ttg 344
His Thr Ser Asn Asp Ser Arg Gly Lys Val Gly Asn Lys Ala Tyr Leu
      85                      90                      95

gag agg tgg cta act tca atc cca cca ctg ttt gct gga gaa tca gtg 392
Glu Arg Trp Leu Thr Ser Ile Pro Pro Leu Phe Ala Gly Glu Ser Val
  100                      105                      110                      115

ttc caa atc aac ttt caa tgg gat gaa aat ttt gga ttt cca gga gct 440
Phe Gln Ile Asn Phe Gln Trp Asp Glu Asn Phe Gly Phe Pro Gly Ala
      120                      125                      130

ttc ttc ata aaa aat gga cat aca agt gaa ttc ttt ctc aaa tct ctc 488
Phe Phe Ile Lys Asn Gly His Thr Ser Glu Phe Phe Leu Lys Ser Leu
      135                      140                      145

act ctt gat gat gtt cct ggc tat ggc aga gtc cat ttt gat tgc aat 536
Thr Leu Asp Asp Val Pro Gly Tyr Gly Arg Val His Phe Asp Cys Asn
      150                      155                      160

tct tgg gtt tac cct tct gga aga tac aag aaa gat cgc att ttc ttt 584
Ser Trp Val Tyr Pro Ser Gly Arg Tyr Lys Lys Asp Arg Ile Phe Phe
      165                      170                      175

```


5

gcc aat cat gtt tat ctt cca agt caa aca cca aac cct ctt cgt aag	632
Ala Asn His Val Tyr Leu Pro Ser Gln Thr Pro Asn Pro Leu Arg Lys	
180 185 190 195	
tat aga gag gaa gaa ttg tgg aat ttg aga gga gat gga aca gga gaa	680
Tyr Arg Glu Glu Glu Leu Trp Asn Leu Arg Gly Asp Gly Thr Gly Glu	
200 205 210	
aga aag gaa tgg gat aga att tat gac tat gat gtt tat aat gac att	728
Arg Lys Glu Trp Asp Arg Ile Tyr Asp Tyr Asp Val Tyr Asn Asp Ile	
215 220 225	
gct gac cct gat gtt ggt gat cat cgt cct att ctc ggt ggg acg acc	776
Ala Asp Pro Asp Val Gly Asp His Arg Pro Ile Leu Gly Gly Thr Thr	
230 235 240	
gaa tat cct tac cct cgt agg gga aga aca gga cga cca cga tca aga	824
Glu Tyr Pro Tyr Pro Arg Arg Gly Arg Thr Gly Arg Pro Arg Ser Arg	
245 250 255	
aga gac cac aat tat gag agc aga ttg tca cca ata atg agc tta gac	872
Arg Asp His Asn Tyr Glu Ser Arg Leu Ser Pro Ile Met Ser Leu Asp	
260 265 270 275	
atc tat gta cca aaa gat gaa aac ttt ggg cat ttg aag atg tca gat	920
Ile Tyr Val Pro Lys Asp Glu Asn Phe Gly His Leu Lys Met Ser Asp	
280 285 290	
ttc ctt ggt tat aca tta aaa gca ctt tcg ata tca atc aaa cca gga	968
Phe Leu Gly Tyr Thr Leu Lys Ala Leu Ser Ile Ser Ile Lys Pro Gly	
295 300 305	
ctt caa tcc ata ttt gat gta act cca aat gaa ttt gac aat ttt aaa	1016
Leu Gln Ser Ile Phe Asp Val Thr Pro Asn Glu Phe Asp Asn Phe Lys	
310 315 320	
gaa gtt gat aat ctc ttt gag aga ggt ttt ccc att cca ttt aat gct	1064
Glu Val Asp Asn Leu Phe Glu Arg Gly Phe Pro Ile Pro Phe Asn Ala	
325 330 335	
ttt aag acc ctc act gag gac ctc act cca cct ttg ttc aaa gca ctc	1112
Phe Lys Thr Leu Thr Glu Asp Leu Thr Pro Pro Leu Phe Lys Ala Leu	
340 345 350 355	
gtg agg aat gat ggt gaa aaa ttc ctc aaa ttt cct act ccc gaa gtt	1160
Val Arg Asn Asp Gly Glu Lys Phe Leu Lys Phe Pro Thr Pro Glu Val	
360 365 370	
gtc aaa gat aat aaa ata gga tgg agc act gat gaa gaa ttt gca aga	1208
Val Lys Asp Asn Lys Ile Gly Trp Ser Thr Asp Glu Glu Phe Ala Arg	
375 380 385	

gaa atg tta gca gga ccc aat cct cta ttg att cgt cgt ctt gaa gct	1256
Glu Met Leu Ala Gly Pro Asn Pro Leu Leu Ile Arg Arg Leu Glu Ala	
390 395 400	
ttt cca cca aca agt aag ctt gac cca aat gtt tat ggg aat caa aac	1304
Phe Pro Pro Thr Ser Lys Leu Asp Pro Asn Val Tyr Gly Asn Gln Asn	
405 410 415	
agt acc atc act gaa gaa cac ata aag cat ggt tta gat ggt ctt acg	1352
Ser Thr Ile Thr Glu Glu His Ile Lys His Gly Leu Asp Gly Leu Thr	
420 425 430 435	
gtt gat gag gca atg aag caa aac agg ctc tac ata gtg gat ttc cat	1400
Val Asp Glu Ala Met Lys Gln Asn Arg Leu Tyr Ile Val Asp Phe His	
440 445 450	
gat gca tta atg ccc tat ctt aca agg atg aat gca aca tca aca aaa	1448
Asp Ala Leu Met Pro Tyr Leu Thr Arg Met Asn Ala Thr Ser Thr Lys	
455 460 465	
aca tat gcc aca aga aca ttg ctt ctt ttg aaa gat gat ggg act ttg	1496
Thr Tyr Ala Thr Arg Thr Leu Leu Leu Lys Asp Asp Gly Thr Leu	
470 475 480	
aag cca ttg gtt att gag tta gcc ttg cca cat cct caa gga gat caa	1544
Lys Pro Leu Val Ile Glu Leu Ala Leu Pro His Pro Gln Gly Asp Gln	
485 490 495	
ctt ggt gcc att agc aaa cta tac ttt cca gct gaa aat gga gtt caa	1592
Leu Gly Ala Ile Ser Lys Leu Tyr Phe Pro Ala Glu Asn Gly Val Gln	
500 505 510 515	
aaa tcc att tgg caa ttg gct aaa gct tat gta act gtt aat gat gtt	1640
Lys Ser Ile Trp Gln Leu Ala Lys Ala Tyr Val Thr Val Asn Asp Val	
520 525 530	
ggc tac cat caa ctt att agt cat tgg ttg cat act cat gct gta ctt	1688
Gly Tyr His Gln Leu Ile Ser His Trp Leu His Thr His Ala Val Leu	
535 540 545	
gag cca ttt gtg att gca aca cat aga caa ttg agc gtg ctt cat cca	1736
Glu Pro Phe Val Ile Ala Thr His Arg Gln Leu Ser Val Leu His Pro	
550 555 560	
atc cat aag ttg ctt gtt cct cat tac aaa gac act atg ttt ata aat	1784
Ile His Lys Leu Leu Val Pro His Tyr Lys Asp Thr Met Phe Ile Asn	
565 570 575	
gca tct gca aga caa gtt ttg atc aat gcc aat ggt ctt atc gaa aca	1832
Ala Ser Ala Arg Gln Val Leu Ile Asn Ala Asn Gly Leu Ile Glu Thr	

580	585	590	595	
acc cat tat cca tca aaa tat tca atg gag ttg tca tct atc ttg tac				1880
Thr His Tyr Pro Ser Lys Tyr Ser Met Glu Leu Ser Ser Ile Leu Tyr				
600		605	610	
aag gat tgg acc ttc cct gat caa gca tta cct aat aat ctc atg aag				1928
Lys Asp Trp Thr Phe Pro Asp Gln Ala Leu Pro Asn Asn Leu Met Lys				
615		620	625	
aga gga cta gct gtg gag gac tca agt gcc ccc cat gga ctt aga ttg				1976
Arg Gly Leu Ala Val Glu Asp Ser Ser Ala Pro His Gly Leu Arg Leu				
630		635	640	
cta ata aat gat tat cca ttt gct gtt gat ggt ctt gac att tgg tca				2024
Leu Ile Asn Asp Tyr Pro Phe Ala Val Asp Gly Leu Asp Ile Trp Ser				
645		650	655	
gcc att aaa aca tgg gta cag gat tat tgc tgt ctc tac tac aaa gat				2072
Ala Ile Lys Thr Trp Val Gln Asp Tyr Cys Cys Leu Tyr Tyr Lys Asp				
660		665	670	675
gac aat gca gta caa aat gac ttt gaa ctc caa tct tgg tgg aat gag				2120
Asp Asn Ala Val Gln Asn Asp Phe Glu Leu Gln Ser Trp Trp Asn Glu				
680		685	690	
cta aga gag aaa ggc cac gct gac aag aaa cat gaa cca tgg tgg cca				2168
Leu Arg Glu Lys Gly His Ala Asp Lys Lys His Glu Pro Trp Trp Pro				
695		700	705	
aaa atg caa act tta agt gaa tta atc gaa tcc tgc act aca att ata				2216
Lys Met Gln Thr Leu Ser Glu Leu Ile Glu Ser Cys Thr Thr Ile Ile				
710		715	720	
tgg att gct tca gct ctt cat gcc gca gtt aac ttt gga caa tat ccc				2264
Trp Ile Ala Ser Ala Leu His Ala Ala Val Asn Phe Gly Gln Tyr Pro				
725		730	735	
tac gga ggc tat att ctc aat cga cca act aca agt cgt agg ttc atg				2312
Tyr Gly Gly Tyr Ile Leu Asn Arg Pro Thr Thr Ser Arg Arg Phe Met				
740		745	750	755
cct gaa gtt ggc acg gct gag tac aaa gaa ctg gaa tcg aat ccc gaa				2360
Pro Glu Val Gly Thr Ala Glu Tyr Lys Glu Leu Glu Ser Asn Pro Glu				
760		765	770	
aaa gct ttc ttg aga aca ata tgt tca gaa tta caa gca ctt gtt agt				2408
Lys Ala Phe Leu Arg Thr Ile Cys Ser Glu Leu Gln Ala Leu Val Ser				
775		780	785	
att tca att att gaa atc ttg tca aag cat gct tct gat gaa gtt tat				2456

8

Ile Ser Ile Ile Glu Ile Leu Ser Lys His Ala Ser Asp Glu Val Tyr
790 795 800

ctt gga caa aga gct tca att gat tgg act tca gat aaa att gca ttg 2504
Leu Gly Gln Arg Ala Ser Ile Asp Trp Thr Ser Asp Lys Ile Ala Leu
805 810 815

gaa gca ttt gag aaa ttt ggg aaa aat tta ttt gaa gtt gag aat agg 2552
Glu Ala Phe Glu Lys Phe Gly Lys Asn Leu Phe Glu Val Glu Asn Arg
820 825 830 835

atc atg gaa agg aat aaa gag gtg aat ttg aag aat aga tct gga cct 2600
Ile Met Glu Arg Asn Lys Glu Val Asn Leu Lys Asn Arg Ser Gly Pro
840 845 850

gtt aat ttg cct tat act cta ctt gtt cca tca agt aac gaa gga ctc 2648
Val Asn Leu Pro Tyr Thr Leu Leu Val Pro Ser Ser Asn Glu Gly Leu
855 860 865

act gga aga gga att cct aat agt att tct atc taa gttgataaga 2694
Thr Gly Arg Gly Ile Pro Asn Ser Ile Ser Ile
870 875

aagaaaagtg gttcttttta tgggtgacgt gtgtaatttg aaggtcacia attacatttt 2754

aagttgccca cattattatt atgaaggaaa taaatgacca tatttttagt ttaatttaaa 2814

ttaggtagct atagccaact ttaggctctg ttggatttgg aactatctcc aacttatata 2874

tgtactttgt actactatct gatgaataaa agttgtgtgt cttaagaata aaaaaaaaaa 2934

aaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 2964

<210> 4
<211> 878
<212> PRT
<213> Cucumis sativus

<400> 4
Met Phe Gly Ile Gly Lys Asn Ile Ile Glu Gly Ala Leu Asn Thr Thr
1 5 10 15

Gly Asp Leu Ala Gly Ser Val Ile Asn Ala Gly Gly Asn Ile Leu Asp
20 25 30

Arg Val Ser Ser Leu Gly Gly Asn Lys Ile Lys Gly Lys Val Ile Leu
35 40 45

Met Arg Ser Asn Val Leu Asp Phe Thr Glu Phe His Ser Asn Leu Leu
50 55 60

Asp Asn Phe Thr Glu Leu Leu Gly Gly Gly Val Ser Phe Gln Leu Ile 80
 65 70 75
 Ser Ala Thr His Thr Ser Asn Asp Ser Arg Gly Lys Val Gly Asn Lys 95
 85 90
 Ala Tyr Leu Glu Arg Trp Leu Thr Ser Ile Pro Pro Leu Phe Ala Gly 110
 100 105
 Glu Ser Val Phe Gln Ile Asn Phe Gln Trp Asp Glu Asn Phe Gly Phe 125
 115 120
 Pro Gly Ala Phe Phe Ile Lys Asn Gly His Thr Ser Glu Phe Phe Leu 140
 130 135
 Lys Ser Leu Thr Leu Asp Asp Val Pro Gly Tyr Gly Arg Val His Phe 160
 145 150 155
 Asp Cys Asn Ser Trp Val Tyr Pro Ser Gly Arg Tyr Lys Lys Asp Arg 175
 165 170
 Ile Phe Phe Ala Asn His Val Tyr Leu Pro Ser Gln Thr Pro Asn Pro 190
 180 185
 Leu Arg Lys Tyr Arg Glu Glu Glu Leu Trp Asn Leu Arg Gly Asp Gly 205
 195 200
 Thr Gly Glu Arg Lys Glu Trp Asp Arg Ile Tyr Asp Tyr Asp Val Tyr 220
 210 215
 Asn Asp Ile Ala Asp Pro Asp Val Gly Asp His Arg Pro Ile Leu Gly 240
 225 230 235
 Gly Thr Thr Glu Tyr Pro Tyr Pro Arg Arg Gly Arg Thr Gly Arg Pro 255
 245 250
 Arg Ser Arg Arg Asp His Asn Tyr Glu Ser Arg Leu Ser Pro Ile Met 270
 260 265
 Ser Leu Asp Ile Tyr Val Pro Lys Asp Glu Asn Phe Gly His Leu Lys 285
 275 280
 Met Ser Asp Phe Leu Gly Tyr Thr Leu Lys Ala Leu Ser Ile Ser Ile 300
 290 295
 Lys Pro Gly Leu Gln Ser Ile Phe Asp Val Thr Pro Asn Glu Phe Asp 320
 305 310 315
 Asn Phe Lys Glu Val Asp Asn Leu Phe Glu Arg Gly Phe Pro Ile Pro 335
 325 330

WO 01/29227

10

Phe Asn Ala Phe Lys Thr Leu Thr Glu Asp Leu Thr Pro Pro Leu Phe
 340 345 350

Lys Ala Leu Val Arg Asn Asp Gly Glu Lys Phe Leu Lys Phe Pro Thr
 355 360 365

Pro Glu Val Val Lys Asp Asn Lys Ile Gly Trp Ser Thr Asp Glu Glu
 370 375 380

Phe Ala Arg Glu Met Leu Ala Gly Pro Asn Pro Leu Leu Ile Arg Arg
 385 390 395 400

Leu Glu Ala Phe Pro Pro Thr Ser Lys Leu Asp Pro Asn Val Tyr Gly
 405 410 415

Asn Gln Asn Ser Thr Ile Thr Glu Glu His Ile Lys His Gly Leu Asp
 420 425 430

Gly Leu Thr Val Asp Glu Ala Met Lys Gln Asn Arg Leu Tyr Ile Val
 435 440 445

Asp Phe His Asp Ala Leu Met Pro Tyr Leu Thr Arg Met Asn Ala Thr
 450 455 460

Ser Thr Lys Thr Tyr Ala Thr Arg Thr Leu Leu Leu Lys Asp Asp
 465 470 475 480

Gly Thr Leu Lys Pro Leu Val Ile Glu Leu Ala Leu Pro His Pro Gln
 485 490 495

Gly Asp Gln Leu Gly Ala Ile Ser Lys Leu Tyr Phe Pro Ala Glu Asn
 500 505 510

Gly Val Gln Lys Ser Ile Trp Gln Leu Ala Lys Ala Tyr Val Thr Val
 515 520 525

Asn Asp Val Gly Tyr His Gln Leu Ile Ser His Trp Leu His Thr His
 530 535 540

Ala Val Leu Glu Pro Phe Val Ile Ala Thr His Arg Gln Leu Ser Val
 545 550 555 560

Leu His Pro Ile His Lys Leu Leu Val Pro His Tyr Lys Asp Thr Met
 565 570 575

Phe Ile Asn Ala Ser Ala Arg Gln Val Leu Ile Asn Ala Asn Gly Leu
 580 585 590

Ile Glu Thr Thr His Tyr Pro Ser Lys Tyr Ser Met Glu Leu Ser Ser
 595 600 605

Ile Leu Tyr Lys Asp Trp Thr Phe Pro Asp Gln Ala Leu Pro Asn Asn
 610 615 620

Leu Met Lys Arg Gly Leu Ala Val Glu Asp Ser Ser Ala Pro His Gly
 625 630 635 640

Leu Arg Leu Leu Ile Asn Asp Tyr Pro Phe Ala Val Asp Gly Leu Asp
 645 650 655

Ile Trp Ser Ala Ile Lys Thr Trp Val Gln Asp Tyr Cys Cys Leu Tyr
 660 665 670

Tyr Lys Asp Asp Asn Ala Val Gln Asn Asp Phe Glu Leu Gln Ser Trp
 675 680 685

Trp Asn Glu Leu Arg Glu Lys Gly His Ala Asp Lys Lys His Glu Pro
 690 695 700

Trp Trp Pro Lys Met Gln Thr Leu Ser Glu Leu Ile Glu Ser Cys Thr
 705 710 715 720

Thr Ile Ile Trp Ile Ala Ser Ala Leu His Ala Ala Val Asn Phe Gly
 725 730 735

Gln Tyr Pro Tyr Gly Gly Tyr Ile Leu Asn Arg Pro Thr Thr Ser Arg
 740 745 750

Arg Phe Met Pro Glu Val Gly Thr Ala Glu Tyr Lys Glu Leu Glu Ser
 755 760 765

Asn Pro Glu Lys Ala Phe Leu Arg Thr Ile Cys Ser Glu Leu Gln Ala
 770 775 780

Leu Val Ser Ile Ser Ile Ile Glu Ile Leu Ser Lys His Ala Ser Asp
 785 790 795 800

Glu Val Tyr Leu Gly Gln Arg Ala Ser Ile Asp Trp Thr Ser Asp Lys
 805 810 815

Ile Ala Leu Glu Ala Phe Glu Lys Phe Gly Lys Asn Leu Phe Glu Val
 820 825 830

Glu Asn Arg Ile Met Glu Arg Asn Lys Glu Val Asn Leu Lys Asn Arg
 835 840 845

Ser Gly Pro Val Asn Leu Pro Tyr Thr Leu Leu Val Pro Ser Ser Asn
 850 855 860

Glu Gly Leu Thr Gly Arg Gly Ile Pro Asn Ser Ile Ser Ile
 865 870 875

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

PCT Application No

PCT/00/09912

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 C12N15/53 C12N9/02 A01H5/00 C12N5/10 A01K67/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 C12N A01K A01H

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

BIOSIS

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	TATULIAN SUREN A: "Ca ²⁺ -dependent membrane binding of soybean lipoxygenase-1: Possible implication of the N-terminal beta-barrel domain." FASEB JOURNAL, vol. 12, no. 8, 24 April 1998 (1998-04-24), page A1285 XP000982453 Meeting of the American Society for Biochemistry and Molecular Biology; Washington, D.C., USA; May 16-20, 1998 ISSN: 0892-6638	
A	DE 196 41 158 A (SCHMIDT M A) 9 April 1998 (1998-04-09)	

☐ Further documents are listed in the continuation of box C.☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents:

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- *Z* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

23 February 2001

Date of mailing of the international search report

06/03/2001

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Espen, J

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/EP 00/09912

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
---	---------------------	----------------------------	---------------------

DE 19641158 A	09-04-1998	NONE	
---------------	------------	------	--

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

tr. Aktenzeichen
PCT/00/09912

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES
IPK 7 C12N15/53 C12N9/02 A01H5/00 C12N5/10 A01K67/00

Nach der internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 7 C12N A01K A01H

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

BIOSIS

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
------------	--	--------------------

A	TATULIAN SUREN A: "Ca ²⁺ -dependent membrane binding of soybean lipoxygenase-1: Possible implication of the N-terminal beta-barrel domain." FASEB JOURNAL, Bd. 12, Nr. 8, 24. April 1998 (1998-04-24), Seite A1285 XP000982453 Meeting of the American Society for Biochemistry and Molecular Biology; Washington, D.C., USA; May 16-20, 1998 ISSN: 0892-6638	
---	--	--

A	DE 196 41 158 A (SCHMIDT M A) 9. April 1998 (1998-04-09)	
---	---	--

☐ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

☒ Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

A Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

E älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

L Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

O Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

P Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

T Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

X Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

Y Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

g Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

23. Februar 2001

Absendedatum des internationalen Recherchenberichts

06/03/2001

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Espen, J

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 00/09912

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
DE 19641158 A	09-04-1998	KEINE	

VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT
AM DEM GEBIET DES PATENTWESENS

PCT

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

(Artikel 18 sowie Regeln 43 und 44 PCT)

Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts 0050/050815	WEITERES VORGEHEN siehe Mitteilung über die Übermittlung des internationalen Recherchenberichts (Formblatt PCT/ISA/220) sowie, soweit zutreffend, nachstehender Punkt 5	
Internationales Aktenzeichen PCT/EP 00/09912	Internationales Anmeldedatum (Tag/Monat/Jahr) 10/10/2000	(Frühestes) Prioritätsdatum (Tag/Monat/Jahr) 21/10/1999
Anmelder BASF AKTIENGESELLSCHAFT et al.		

Dieser internationale Recherchenbericht wurde von der Internationalen Recherchenbehörde erstellt und wird dem Anmelder gemäß Artikel 18 übermittelt. Eine Kopie wird dem Internationalen Büro übermittelt.

Dieser internationale Recherchenbericht umfaßt insgesamt 2 Blätter.

☒ Darüber hinaus liegt ihm jeweils eine Kopie der in diesem Bericht genannten Unterlagen zum Stand der Technik bei.

1. Grundlage des Berichts

- a. Hinsichtlich der **Sprache** ist die internationale Recherche auf der Grundlage der internationalen Anmeldung in der Sprache durchgeführt worden, in der sie eingereicht wurde, sofern unter diesem Punkt nichts anderes angegeben ist.

☐ Die internationale Recherche ist auf der Grundlage einer bei der Behörde eingereichten Übersetzung der internationalen Anmeldung (Regel 23.1 b)) durchgeführt worden.

- b. Hinsichtlich der in der internationalen Anmeldung offenbarten **Nucleotid- und/oder Aminosäuresequenz** ist die internationale Recherche auf der Grundlage des Sequenzprotokolls durchgeführt worden, das

☒ in der internationalen Anmeldung in schriftlicher Form enthalten ist.

☒ zusammen mit der internationalen Anmeldung in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.

☐ bei der Behörde nachträglich in schriftlicher Form eingereicht worden ist.

☐ bei der Behörde nachträglich in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.

☒ Die Erklärung, daß das nachträglich eingereichte schriftliche Sequenzprotokoll nicht über den Offenbarungsgehalt der internationalen Anmeldung im Anmeldezeitpunkt hinausgeht, wurde vorgelegt.

☒ Die Erklärung, daß die in computerlesbarer Form erfaßten Informationen dem schriftlichen Sequenzprotokoll entsprechen, wurde vorgelegt.

2. ☐ Bestimmte Ansprüche haben sich als nicht recherchierbar erwiesen (siehe Feld I).

3. ☐ Mangelnde Einheitlichkeit der Erfindung (siehe Feld II).

4. Hinsichtlich der **Bezeichnung der Erfindung**

☐ wird der vom Anmelder eingereichte Wortlaut genehmigt.

☒ wurde der Wortlaut von der Behörde wie folgt festgesetzt:

DAS BETA-BARREL DER LIPIDKÖRPERLIPOXYGENASE

5. Hinsichtlich der **Zusammenfassung**

☒ wird der vom Anmelder eingereichte Wortlaut genehmigt.

☐ wurde der Wortlaut nach Regel 38.2b) in der in Feld III angegebenen Fassung von der Behörde festgesetzt. Der Anmelder kann der Behörde innerhalb eines Monats nach dem Datum der Absendung dieses internationalen Recherchenberichts eine Stellungnahme vorlegen.

6. Folgende Abbildung der **Zeichnungen** ist mit der Zusammenfassung zu veröffentlichen: Abb. Nr. _____

☐ wie vom Anmelder vorgeschlagen

☐ weil der Anmelder selbst keine Abbildung vorgeschlagen hat.

☐ weil diese Abbildung die Erfindung besser kennzeichnet.

☒ keine der Abb.

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

P 00/09912

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEBIETES

IPK 7 C12N15/53 C12N9/02 A01H5/00 C12N5/10 A01K67/00

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 7 C12N A01K A01H

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

BIOSIS

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	TATULIAN SUREN A: "Ca ²⁺ -dependent membrane binding of soybean lipoxygenase-1: Possible implication of the N-terminal beta-barrel domain." FASEB JOURNAL, Bd. 12, Nr. 8, 24. April 1998 (1998-04-24), Seite A1285 XP000982453 Meeting of the American Society for Biochemistry and Molecular Biology; Washington, D.C., USA; May 16-20, 1998 ISSN: 0892-6638	
A	DE 196 41 158 A (SCHMIDT M A) 9. April 1998 (1998-04-09)	



Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen



Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

A Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

E älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

L Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

O Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

P Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

T Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

X Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

Y Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

* & * Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

23. Februar 2001

Absenddatum des internationalen Recherchenberichts

06/03/2001

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde

Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2260 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Espen, J



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

EP 00/09912

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
DE 19641158 A	09-04-1998	NONE	

